

Einflussfaktoren auf die Stabilität und Aktivität der Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* in Carboligasereaktionen mit aromatischen Aldehyden

Melanie Schwarz

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Bio- und Geowissenschaften (IBG)
Biotechnologie (IBG-1)

Einflussfaktoren auf die Stabilität und Aktivität der Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* in Carboligasereaktionen mit aromatischen Aldehyden

Melanie Schwarz

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health

Band / Volume 35

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-701-6

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek.
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten
sind im Internet über <<http://dnb.d-nb.de>> abrufbar.

Die Autorin dankt den beteiligten Verlagen für die Druckerlaubnis der aufgeführten Artikel.

Herausgeber und Vertrieb: Forschungszentrum Jülich GmbH
Zentralbibliothek, Verlag
D-52425 Jülich
Telefon (02461) 61-5368 · Telefax (02461) 61-6103
E-Mail: zb-publikation@fz-juelich.de
Internet: <http://www.fz-juelich.de/zb>

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2011

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health Band / Volume 35

D 61 (Diss. Düsseldorf, Univ., 2010)

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-701-6

Vollständig frei verfügbar im Internet auf dem Jülicher Open Access Server (JUWEL)
unter <http://www.fz-juelich.de/zb/juwel>

Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (Druck, Fotokopie oder in einem anderen Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation eigenständig verfasst und keine anderen als die im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen, Darstellungen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Textstellen, die wortwörtlich oder sinngemäß anderen Werken oder sonstigen Quellen entnommen sind, habe ich in jedem einzelnen Fall unter genauer Angabe der jeweiligen Quelle, auch der Sekundärliteratur, gekennzeichnet. Ich erkläre hiermit weiterhin, dass die Dissertation in der vorgelegten oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht wurde.

Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

(Datum, Unterschrift)

Wissenschaftliche Publikationen im Rahmen dieser Promotion

Poster Präsentationen

Schwarz, M. J., Lütz, S., Pohl M. (2008). Enzyme inactivating processes in emulsions. *4rd International Congress on Biocatalysis*, Hamburg-Harburg (Deutschland).

Schwarz, M. J., Spieß, A., Pohl M. (2009). Enzyme inactivation in aqueous-organic emulsion systems. *9th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations*, Bern (Switzerland).

Schwarz, M. J., Mackfeld, U., Kocot, C., Spieß, A., Wiechert W., Pohl, M. (2010). Enzyme inactivation in aqueous-organic emulsions with aromatic aldehydes as substrates. *DECHEMA ProcessNet-Jahrestagung 2010 und 28. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen*, Aachen (Deutschland).

Danksagung

Zuerst möchte ich mich besonders bei Frau Prof. Dr. Martina Pohl für die interessante Themenstellung und ihr fortlaufendes Interesse an dieser Arbeit bedanken. Besonders herzlich möchte ich ihr für die außergewöhnlich persönliche und freundschaftliche Betreuung danken. Ich bin froh, dass ich mit ihr zusammenarbeiten durfte und von ihren besonderen fachlichen und menschlichen Fähigkeiten als Arbeitsgruppenleiterin und Wissenschaftlerin profitieren konnte. Vielen Dank für die schöne Zeit!

Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger möchte ich für die Möglichkeit danken meine Promotionsarbeit am Institut für Molekulare Enzymtechnologie (IMET) beginnen zu können.

Während meiner Promotion wechselte die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Martina Pohl an das Institut für Biotechnologie 2 (IBT2). Für die Möglichkeit meine Promotion am IBT2 fertig stellen zu können und die freundliche Übernahme des Korreferats möchte ich Herrn Prof. Dr. Wolfgang Wiechert danken. Des Weiteren möchte ich mich auch für das Engagement und das persönliche Interesse an den Promotionsstudenten von Seiten Herrn Prof. Dr. Wiechert bedanken sowie für seinen Einsatz eine angenehme, kommunikative und produktive Arbeitsatmosphäre am Institut zu schaffen.

Bei Frau Prof. Dr. Antje Spieß von der RWTH-Aachen möchte ich mich sehr herzlich für die Übernahme der Zweitbetreuung im Rahmen des Graduierten-Kollegs BioNoCo (GRK 1166) sowie ihr Engagement für einen erfolgreichen Verlauf dieser Arbeit bedanken. Besonders hilfreich war ihre Unterstützung bei technischen Problemen und Fragestellungen.

Dem Graduiertenkolleg BioNoCo (GRK 1166) möchte ich für die vielen Möglichkeiten der Weiterbildung und der Teilnahme an internationalen Kongressen danken. Den BioNoCo-Mitgliedern danke ich für die freundschaftliche Atmosphäre und interessanten Anregungen. Besonders möchte ich an dieser Stelle bei Dr. Michael Zavrel und bei Dr. Anne van den Wittenboer, nicht nur für ihre fachlichen Ratschläge, Hilfestellungen und Diskussionen, bedanken.

Meinen Büronachbarn im Büro 124 (IBT2) Tina Gerhards, Kerstin Würges, Carmen Kocot und auch Daniel Okrob und Roland Moussa – möchte ich für die schöne Zeit, die

Hilfestellungen und ihre Freundschaft danken. Der AG Biokatalyse und Biosensoren möchte ich für die freundliche Atmosphäre und Integration in die Arbeitsgruppe danken. Hierbei möchte ich Dr. Tina Kubitzki besonders erwähnen, die mit großem Einsatz an der gelungenen Zusammenführung der beiden Arbeitsgruppen gearbeitet hat. Bei Ilona Frindi-Wosch möchte ich mich für die Einarbeitung und Hilfestellung bei der Protein-Reinigung bedanken.

Mein ganz besonderer Dank geht an dieser Stelle an Ursula Mackfeld, die mit ihren Ideen, einer unvergleichbaren Motivation, ihrer Fachkenntnis und ihrem persönlichen Einsatz diese Arbeit bereichert hat. Ohne sie wäre die Arbeit in diesem Rahmen wohl nicht möglich gewesen.

Mein persönlicher Dank geht auch an „alte“ Kollegen am IMET: Dr. Benjamin Franken der immer gerne sein fachliches Wissen mit mir geteilt hat, Dr. Ulrich Krauß der mir in allen Fragen zur Fluoreszenz zur Seite stand, und ohne die beiden hätte ich wohl nie von der Schroedinger Katze erfahren! Dr. Jan Guterl möchte ich für noch für die eingehenden Gespräche, v. a. über außerfachliche Themen danken und allen für den Spaß, den wir gemeinsam hatten. Nicht zu vergessen Astrid Wirtz für ihre Hilfestellung an der HPLC und die gemütlichen Kaffeepausen. Allen „alten“ Mitgliedern der AG Pohl danke ich für die gute Zusammenarbeit. Ganz besonders möchte ich Dr. Geraldine Kolter danken, die mir nicht nur eine gute Kollegin war, sondern auch eine ganz besondere Freundin ist. Zudem bedanke ich mich bei allen Mitgliedern des IMETs für das angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Besonders meiner Mutter Doris Schwarz möchte ich sehr herzlich dafür danken, dass sie mich immer unterstützt und an mich geglaubt hat. Weiterhin hat sie mich gelehrt, gegen alle Widerstände und Rückschläge meinen Weg zu gehen. Auch meiner Schwester Bianca Schwarz möchte ich mich noch mal besonders für ihre Unterstützung danken. Meinem Partner Ron-Patrick Cadeddu danke ich für seine Hilfe bei Computerfragen, seine Geduld und die Kraft, die er mir gibt. Auch möchte ich seinen Eltern Monika und Alessandro Cadeddu sowie seiner Familie für die langjährige Unterstützung und ihr Interesse danken.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, die mich auf den Weg gebracht haben....

1	EINLEITUNG	1
1.1	BIOKATALYSATOREN: INDUSTRIELLE RELEVANZ UND FORSCHUNG	1
1.2	UNKONVENTIONELLE REAKTIONSMEDIEN.....	4
1.2.1	Enzymreaktionen in wasserfreien unkonventionellen Medien	5
1.2.2	Reaktionssysteme mit wassermischbaren Kosolventien	6
1.2.3	Zweiphasensysteme.....	7
1.2.3.1	Wässrig-organische Zweiphasensysteme.....	7
1.2.3.1.1	Stabilität von Enzymen in wässrig-organischen Zweiphasensystemen.....	11
1.3	BEDEUTUNG UND SYNTHESE CHIRALER 2-HYDROXYKETONE	13
1.4	THIAMINDIPHOSPHAT-ABHÄNGIGE ENZYME	16
1.4.1	Der Kofaktor Thiamindiphosphat (ThDP)	16
1.4.2	Reaktionszyklus ThDP-abhängiger Enzyme.....	18
1.4.3	Struktur ThDP-abhängiger Enzyme	21
1.4.4	Spezielle Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme	23
1.4.4.1	Benzoylformiatdecarboxylase (BFD) aus <i>Pseudomonas putida</i>	23
1.4.4.2	Benzaldehydlyase (BAL) aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>	24
1.4.4.3	BAL und BFD: Struktur, Aktivität und Stabilität im Vergleich.....	26
1.5	AKTIVITÄT UND STABILITÄT DER BAL IN UNKONVENTIONELLEN MEDIEN.....	29
1.5.1	Verwendung von Kosolventien.....	29
1.5.2	BAL in wässrig-organischen Zweiphasensystemen.....	33
2	MOTIVATION UND ZIELSETZUNG	37
3	MATERIAL UND METHODEN	38
3.1	MATERIAL	38
3.1.1	Chemikalien und Enzyme	38
3.1.2	Geräte	38
3.1.3	Computerprogramme und Datenbanken	39
3.1.4	Bakterienstämme	40
3.1.5	Plasmide	40
3.2	PH-MESSUNG	41
3.2.1	pH-Messung in rein wässrigen Puffern	41
3.2.2	pH-Messung nach Zugabe organischer Substanzen.....	41
3.3	KULTIVIERUNG VON BAKTERIENSTÄMMEN	42
3.3.1	Nährmedien	42
3.3.2	Kultivierung von Flüssig- und Plattenkulturen	42
3.3.3	Kultivierung von Proteinexpressionskulturen	42

3.3.4	Hochzelldichtekultivierung	43
3.3.5	Bestimmung der Zelldichte	44
3.3.6	Proteinexpression der BAL-Varianten	44
3.4	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	44
3.4.1	Präparation von Plasmid-DNA	44
3.4.2	Agarose-Gelelektrophorese	44
3.4.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	45
3.4.4	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	45
3.4.5	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	46
3.4.6	Sequenzierung von DNA	46
3.5	PROTEINCHEMISCHE METHODEN	46
3.5.1	Zellaufschluss mittels Sonifikation	46
3.5.2	Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford	47
3.5.3	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	48
3.5.4	Färbung von SDS-Gelen	49
3.5.4.1	Färben von SDS-Gelen mittels Coomassie	49
3.5.4.2	Färben von SDS Gelen mittels Silberfärbung	49
3.6	REINIGUNG UND LAGERUNG REKOMBINANTER PROTEINE	49
3.6.1	Reinigung mittels Immobilisierter Metallaffinitätschromatographie über eine Ni^{2+} -NTA-Matrix	49
3.6.2	Größenausschlusschromatographie mittels Sephadex G-25 Matrix	50
3.6.3	Lagerung gereinigter Proteine	51
3.7	SYNTHESE VON BENZOIN-DERIVATEN	51
3.7.1	Synthese von 3,3',5,5'-Tetramethoxybenzoin	51
3.7.2	Synthese von 4,4'-Dichlorbenzoin	52
3.8	HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE (HPLC)	52
3.8.1	Reversed-phase HPLC	53
3.8.1.1	Kalibrierung	54
3.8.2	Chirale-Analytik	55
3.9	BESTIMMUNG DER ENZYMAKTIVITÄTEN	56
3.9.1	Kontinuierliche Aktivitätstests	56
3.9.1.1	Gekoppelter photometrischer Test zur Bestimmung der Decarboxylaseaktivität (BFDH281A)	56
3.9.1.2	Gekoppelter photometrischer Test zur Bestimmung der Lyaseaktivität (BAL)	58
3.9.1.3	Etablierung eines direkten fluoreszenzphotometrischen Test zur Bestimmung der Ligaseaktivität (BAL)	59
3.9.1.3.1	Etablierung des fluoreszenzphotometrischen Aktivitätstests am LS-50B	61

3.9.1.3.2	Anpassung des fluoreszenzphotometrischen Aktivitätstest am Fluorolog 3-22 (Horiba Jobin Yvon)	72
3.9.2	Diskontinuierliche Aktivitätstests (BAL).....	78
3.9.2.1	Ermittlung der Ligaseaktivität abhängig von der 4-Chlorbenzaldehydkonzentration	79
3.9.2.2	Ermittlung der Ligaseaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert	79
3.9.2.3	Ermittlung der Lyaseaktivität abhängig von der 4,4'-Dichlorbenzoinkonzentration	80
3.9.3	Bestimmung der kinetischen Parameter (V_{\max} und K_M).....	80
3.9.4	Kolorimetrischer Test.....	81
3.10	BESTIMMUNG DER ENZYMSTABILITÄTEN	82
3.10.1	Stabilität gegenüber Rühreffekten	82
3.10.1.1	Bestimmung der Stabilität gegenüber magnetischem Rühren	82
3.10.1.2	Bestimmung der Stabilität mittels Schaufelrührer	83
3.10.2	Bestimmung der Stabilität in 2-Phasen	84
3.10.3	Bestimmung der Stabilität gegenüber aromatischen Aldehyd Substraten	85
3.10.4	Ermittlung der Desaktivierungskonstanten k_{des} und der Halbwertszeit.....	87
3.10.5	Stabilität der BAL und der BAL-Deletionsvarianten in Puffer	89
3.11	REAKTIVIERUNGSANALYSEN	89
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	91
4.1	UNTERSUCHUNGEN DER VERSCHIEDENEN EINFLUSSFAKTOREN AUF DIE STABILITÄT DER BAL	91
4.1.1	Stabilität gegenüber Rühreffekten.....	91
4.1.2	Einfluss des pH-Wertes auf die Rührstabilität	97
4.1.3	Einfluss einer Grenzfläche auf die Stabilität der BAL.....	100
4.1.4	Einfluss von Substraten auf die Stabilität der BAL	104
4.1.5	Umstellung des Test- und des Puffersystems zur Ermittlung der Stabilität der BAL gegenüber aromatischen Aldehyden	105
4.1.6	Ermittlung des Einfluss von Benzaldehyd auf die Stabilität der BAL mittels des HPLC-basierten Testsystems	106
4.1.7	Einfluss aromatischer Aldehyde auf die Stabilität der BFDH281A	108
4.2	ANALYSE DER ENZYM-INKTIVIERENDEN EFFEKTE DURCH VERSCHIEDENE AROMATISCHE ALDEHYDE	108
4.2.1	Inaktivierung der BAL durch verschiedene Benzaldehyd-Derivate	109
4.2.2	Einfluss des pH auf die Stabilität der BAL mit aromatischen Substraten	113
4.2.3	Reaktivierung nach Entfernung der Aldehyde	116
4.2.4	Abhängigkeit der Inaktivierung vom Enzym-Substrat Verhältnis	120

4.3	MÖGLICHKEITEN ZUR STABILISIERUNG DER BAL	126
4.3.1	Vergleich von Aktivität und Stabilität der BAL gegenüber aromatischen Aldehyden bei verschiedenen pH-Werten.....	127
4.3.2	Hypothese: Inaktivierung durch Schiffbasenbildung	134
4.3.2.1	Vergleichende Analyse der Lysinreste in BAL und BFD	134
4.3.2.2	BAL-Varianten zur Überprüfung der Schiffbasen-Hypothese	137
4.3.3	Überprüfung von strukturell der BFD angeglichenen BAL-Varianten.....	139
4.3.3.1	Planung und Charakterisierung von BFD ähnlichen BAL Varianten.....	139
4.3.3.2	Einfluss des C-Terminus auf die Stabilität der BAL gegenüber aromatischen Aldehyden.....	144
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	150
6	CONCLUSION AND OUTLOOK.....	155
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	160

Organische Lösungsmittel und Reaktanden

2-HPP	2-Hydroxypropiophenon / 2-Hydroxy-1-phenylpropan-1-on
BA	Benzaldehyd
BrBA	Brombenzaldehyd
BZ	Benzoin
CIBA	Chlorbenzaldehyd
DCIBZ	Dichlorbenzoin
DFBA	Difluorbenzaldehyd
DMBA	3,5-Dimethoxybenzaldehyd
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
FBA	Fluorbenzaldehyd
MBA	Methoxybenzaldehyd
MIBK	Methylisobutylketon
mPEG	Methoxy-Polyethylenglykol
MTBE	<i>tert</i> -Butylmethylether
NOBA	Nitrobenzaldehyd
PAC	Phenylacetylcarbinol/1-Hydroxy-1-phenylpropan-2-on
PEG	Polyethylenglykol
TBA	Tolylbenzaldehyd (=Methoxybenzaldehyd)
TMBZ	3,3',5,5'-Tetramethoxybenzoin

Enzyme, Proteine und Aminosäuren

BAL	Benzaldehydlyase
BFD	Benzoylformiatdecarboxylase
BSA	Bovines Serum Albumin
C-Terminus	Carboxyterminus
His ₆	Hexahistidin
HL-ADH	Alkoholdehydrogenase aus der Pferdeleber
N-Terminus	Aminoternus
PDC	Pyruvatdecarboxylase
Ala	Alanin
Asn	Asparagin
Cys	Cystein
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin

His	Histidin
Ile	Isoleucin
Leu	Leucin
Lys	Lysin
Phe	Phenylalanin
Ser	Serin
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
A	Alanin
D	Aspartat
E	Glutamat
F	Phenylalanin
G	Glycin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Mehionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin

Allgemeine Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
ca.	circa
cps	gezählte Protonen pro Sekunde (<i>counts per second</i>)
DC	Dünnschichtchromatographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure

Abkürzungen

dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuss (<i>enantiomeric excess</i>)
FF	Messung der Anregung und Emission in einem Winkel von 22,5° (<i>front face</i>)
fwd	<i>forward</i>
g	Gramm
h	Stunde(n)
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (<i>high performance/pressure liquid chromatography</i>)
IMAC	Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
k_{cat}	Wechselzahl
kDa	Kilo Dalton
K_{des}	Desaktivierungskonstante
K_{M}	Michaelis Konstante
Kpi-Puffer	Kaliumphosphatpuffer
L	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
Lsg.	Lösung
M	mol/Liter
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol/Liter
n	Anzahl unabhängiger Experimente
NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid
NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
p.a.	<i>per analyse</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFTE	Polytetrafluoroethylene (Teflon)
pK _s	Säurekonstante
pmol	Picomol

PVA	Polyvinylalkohol
RA	Messung der Anregung und Emission im rechten Winkel (<i>right angle</i>)
rev	<i>reverse</i>
RT	Raumtemperatur
SD	Schichtdicke
SDS	Sodium-dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sek	Sekunde(n)
T	Temperatur
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TEA	Triethanolamin
tech.	technisch
TEMED	Tetramethylethyldiamin
ThDP	Thiamindiphosphat
TMF	Transformationspuffer für <i>E. coli</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
U	<i>Unit</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
Ü/N	Über Nacht
V	Volt
v	Reaktionsrate
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
VE	voll entsalzt
V_{\max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
vol%	Volumen Prozent
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)

1 Einleitung

1.1 Biokatalysatoren: industrielle Relevanz und Forschung

Die meisten biochemischen Prozesse in lebenden Zellen, zum Beispiel im Metabolismus, werden von Enzymen katalysiert. Doch gewinnen sie zunehmend an Bedeutung in technischen Anwendungen. In der Biotechnologie werden zum einen isolierte Enzyme, Zellrohextrakte, metabolisch inaktive Zellen (Biotransformation) oder auch lebende Zellen (Fermentation) für die Synthese genutzt (Stürmer und Breuer, 2006). Hierbei werden häufig auch Substanzen umgesetzt werden, die im normalen Stoffwechsel keine Rolle spielen (Stürmer und Breuer, 2006), denn viele Enzyme katalysieren neben der eigentlichen Hauptreaktion, auch die Umsetzung ähnlicher Substrate (Promiskuität) bzw. sie katalysieren andere Nebenreaktionen. Es wird angenommen, dass diese funktionelle Promiskuität durch die hohe Flexibilität in der Enzymstruktur (konformative Diversität) ermöglicht wird. Darüber hinaus wird vermutet, dass diese Flexibilität in Struktur und Funktion die Anpassung an veränderte Lebensbedingungen ermöglichen soll (James und Tawfik, 2003). Aus biotechnologischer Sicht ergeben sich hieraus eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten.

Zu Beginn wurden Enzyme für die industrielle Anwendung meist nur in Betracht gezogen, wenn kein entsprechender chemischer Prozess zur Verfügung stand. Aber Enzyme können gegenüber chemischen Katalysatoren gewisse Vorteile aufweisen. In der modernen Industrie gewinnt die Umweltfreundlichkeit und Nachhaltigkeit von chemischen Prozessen („grüne Chemie“) immer mehr an Bedeutung. Durch das Arbeitsoptimum von Enzymen bei milden Bedingungen, wässrigen Reaktionsmedien, niedrigen Temperaturen und neutralen pH-Werten können Energieaufwand und Umwelt-belastende Medien reduziert werden. Besonders wichtige Faktoren sind auch ihre Regio-, Chemo- und Enantioselektivität. So entfallen ungünstige, ungewollte oder sogar toxische Nebenprodukte. Einen Sonderstatus in der pharmazeutischen Industrie erlangten Enzyme vor allem durch ihre Enantioselektivität. Denn obwohl zwei Enantiomere dieselben chemischen und physikalischen Eigenschaften besitzen, können ihre Wirkungen im biologischen System vollkommen unterschiedlich sein. Während ein Enantiomer eines Wirkstoffes die gewünschte Wirkung erzielt, kann das andere Enantiomer fatale Folgen haben (Rouhi, 2003). Aufgrund dieser Erkenntnis werden seit 1996 durch die FDA (*Food and Drug Administration*), im Falle enantiomerer Verbindungen, nur noch enantiomerenreine Wirkstoffe in Pharmazeutika zugelassen (Stinson, 1998, Stinson, 1999). 1991 waren nur etwa 20% der neu eingeführten Pharmazeutika enantiomerenrein,

2006 schon 80% (Stürmer und Breuer, 2006). Eine Reihe dieser chiralen pharmazeutischen Intermediate wird heutzutage durch biokatalytische Prozesse gewonnen (Patel, 2008).

Aber auch in anderen industriellen Zweigen gewinnen enzymatisch katalysierte Prozesse an Bedeutung. So löste z.B. die Bildung von Acrylamid durch die Nitrilhydratase, die klassische chemische Produktion ab. Während mit der chemischen Kupferkatalyse nur Partialumsätze erreicht wurden und so eine aufwendige Aufarbeitung über Ionenaustauscher zur Entfernung des Substrates notwendig war, konnte durch die biokatalytische Reaktion ein Umsatz von 99,97% erreicht werden. Zusätzlich sind die Reaktionsbedingungen mit 15 °C sehr mild und machen eine weitere Nachbehandlung des Roh-Acrylamids unnötig (Stürmer und Breuer, 2006). Mehrstufige Prozesse, können durch den Einsatz von Enzymen vereinfacht werden, wie z.B. bei der Produktion von Vitamin C oder Vitamin B2, so konnten nicht nur Zeitaufwand und Produktionskosten gesenkt sondern auch toxische Zwischenprodukte vermieden werden (Stürmer und Breuer, 2006, Wohlgemuth, 2009). Veit von der Firma Evonik (ehemals Degussa) beschreibt die Vorteile der enzymatisch katalysierten Fettsäure-Ester Produktion für die kosmetische Industrie. Zum Beispiel wird durch die milderen Reaktionsbedingungen nicht nur der Energieaufwand verringert, sondern auch unerwünschte Verfärbungen des Produktes vermieden. Des Weiteren wird durch die hohe Selektivität die Bildung von unerwünschten Nebenprodukten umgangen. So werden unerwünschte Eigenschaften im Endprodukt minimiert und eine Reihe aufwendiger Aufarbeitungsprozesse entfällt. Damit ist die Produktion schneller, effizienter und umweltfreundlicher (Veit, 2004).

Im Jahr 2000 wurden weltweit biotechnologische Produkte mit einem Wert von 60 Mrd. US \$ umgesetzt (Stürmer und Breuer, 2006). Ermöglicht wurde diese Entwicklung durch weit reichende Fortschritte in verschiedenen Forschungsbereichen. Durch die Entschlüsselung des Genoms einer Vielzahl von Organismen ist es möglich, potentiell interessante Enzyme über Homologie-Analysen zu identifizieren. Durch stetig optimierte Klonierungstechniken, Etablierung einfach zu handhabender Expressionsstämme für verschiedene Bedürfnisse sowie automatisierte Protein-Reinigungstechniken ist der Zugang zu großen Mengen dieser Enzyme mit relativ geringem Aufwand möglich. Metagenomprojekte, in Verbindung mit Hochdurchsatz-Tests zur Identifikation spezifischer Reaktionen, ermöglichen den Zugang zu Biokatalysatoren unbekannter oder im Labor nicht kultivierbarer Mikroorganismen. Durch die gerichtete Evolution werden durch mehr oder weniger zufällige Mutationen und anschließende Selektion auf spezifische Eigenschaften, Enzyme optimiert. In Kombination

mit Röntgenstrukturanalysen, Computermodellen und Struktur-Funktionsanalysen wird so ein besseres Verständnis für die Funktionsweise von Enzymen entwickelt. Basierend auf diesen Erkenntnissen, können gezielt Mutationen eingefügt und spezielle Eigenschaften eines Enzyms verändert werden. Durch Immobilisierung wird in vielen Fällen die Stabilität erhöht und die Wiedergewinnung der Enzyme erleichtert.

Die stetige Forschung in diesen Bereichen soll unter anderem die im Folgenden genannten Nachteile von Enzymen minimieren, welche die industrielle Anwendung beschränken können. Ein wichtiger Faktor ist dabei der Preis für die Enzymherstellung; eine hohe Effizienz in Produktion und Reinigung von Enzymen ist von Nöten (Krishna, 2002). Eine Reihe von Enzymen benötigt Kofaktoren, wie NAD(P)H oder ATP, diese stellen einen großen Kostenfaktor da. Diese Kosten sollen durch die Entwicklung effizienter und mit wenig Aufwand verbundener Kofaktorregenerations-Prozesse im selben Reaktionsansatz minimiert werden (Liu und Wang, 2007). Ein großes Problem stellt auch die geringe Stabilität von Enzymen unter Lager- und/oder Prozessbedingungen, verglichen mit vielen chemischen Katalysatoren, dar. Auch die Sensibilität gegenüber hohen Temperaturen kann in einigen Anwendungen problematisch sein. Ein möglichst geringer Aufwand für die Einbindung enzymatisch katalysierter Reaktionen in bestehende industrielle Prozesse sollte möglich sein. Kaum ein Unternehmen wird einen teuren Umbau seiner Anlagen finanzieren, wenn es effizienter und kostengünstiger ist die bereits vorhandenen Anlagen zu nutzen. Lange Zeit galt auch die Anwendung von Enzymen in rein wässrigen Medien für viele Prozesse als ungünstig, da eine Vielzahl der organischen Substrate und Produkte hydrophob und damit schlecht wasserlöslich sind. Mittlerweile ist aber für eine Reihe von Enzymen bekannt, dass sie auch in Anwesenheit von unkonventionellen Medien arbeiten können. So können z.B. wassermischbare und nicht mischbare organische Lösungsmittel eingesetzt werden oder sogar ganz auf den Einsatz von Wasser im Reaktionsmedium verzichtet werden (Kapitel 1.2).

Oft werden die chemische und enzymatische Katalyse als Konkurrenten angesehen, aber die unterschiedlichen Eigenschaften und der Zugang zu unterschiedlichen Produkten ermöglichen eine gute Ergänzung beider Methoden (Whitesides und Wong, 1985). Aufgrund der stetigen Entwicklungen in beiden Bereichen, ist sogar die Kombination von Chemo- und Enzymkatalyse möglich. Die Möglichkeit Enzyme auch in unkonventionellen Reaktionssystemen und bei hohen Drücken einsetzen zu können sowie die Entwicklung anorganischer chemischer Katalysatoren, welche auch bei milden Temperaturen und/oder wässrigen

Bedingungen eingesetzt werden können, eröffnet neue Möglichkeiten zur chemo-enzymatischen Synthese in einem Reaktionsansatz (Vennestrom *et al.*, 2010).

1.2 Unkonventionelle Reaktionsmedien

Lange wurde die Biokatalyse in rein wässrigen Systemen durchgeführt. Dies mag unter anderem auf dem Missverständnis beruhen, dass die natürliche Umgebung in der Zelle ein hauptsächlich wässriges Milieu darstellt. In Wirklichkeit stellt das Zytoplasma einer Zelle ein dicht gepacktes Kompartiment einer Vielzahl von Proteinen, RNA und weiteren Zellkomponenten dar, welche zwangsläufig engen Kontakt zueinander haben und sich gegenseitig beeinflussen. Die natürliche Umgebung von Enzymen ist daher weniger wässrig sondern besteht eher aus einem viskosen Zytoplasma (McGuffee und Elcock, 2010). Möglicherweise stellen deshalb rein wässrige Systeme für die Biokatalyse isolierter Enzyme nicht unbedingt das optimale Reaktionsmedium dar. So können z.B. durch Zusatz von Zuckern, Salzen, freien Aminosäuren und unkonventionellen Medien z.B. als Kosolventien Aktivität und Stabilität von Enzymen teilweise signifikant verbessert werden (Kumar und Prakash, 2003).

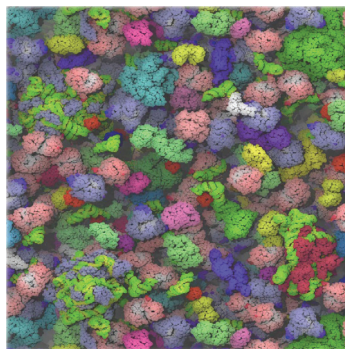


Abb. 1: Modell eines Ausschnitts des Zytoplasma in *E. coli*. Das Modell beruht auf Berechnungen mit 50 verschiedenen Makromolekülen im Zytoplasma (45 Proteine und 5 RNAs oder RNA-Protein Komplexen) ausgehend von insgesamt 1008 Einzelmolekülen (McGuffee und Elcock, 2010).

Als unkonventionelle Reaktionsmedien in der Biokatalyse werden Systeme angesehen, die zum großen Teil oder komplett aus nicht wässrigen Medien bestehen. In den letzten 30 Jahren wurde die Anwendung von Enzymen in einer Reihe unkonventioneller Medien, wie organischen Lösungsmitteln, ionischen Flüssigkeiten, überkritischen Fluiden, mit Festkörpern z.B. Gelmatrices oder in der Gasphase (geeignet für flüchtige Reaktanden) untersucht (Halling, 2004, Kim *et al.*, 2007, Vermue und Tramper, 1995). Meist sind in der Literatur unkonventionelle Reaktionssysteme mit organischen Lösungsmitteln beschrieben, an diesen

wird am längsten geforscht und sie finden bereits auch industrielle Anwendung. Allgemein lassen sich unkonventionelle Medien als Reaktionsmedien mit reduziertem Wasseranteil beschreiben. Ein wichtiger Vorteil ist ihr meist gutes Lösungsvermögen für hydrophobe, in Wasser nur schwer lösliche organischen Verbindungen. Des Weiteren können unkonventionelle Medien das chemische Reaktionsgleichgewicht verändern, so dass Produktausbeuten erhöht werden können (Halling, 1990, Vermue und Tramper, 1995). Nicht selten wurde ein Einfluss auf die Stereo-, Regio-, Chemo- und sogar Substratspezifität von Enzymen beobachtet (Carrea und Riva, 2000, Kim *et al.*, 2003, Klibanov, 2001) welche zu einer Optimierung von chemischen Syntheseprozessen führen oder sogar Zugang zu neuen chemischen Synthesen ermöglichen.

1.2.1 Enzymreaktionen in wasserfreien unkonventionellen Medien

„Einphasige“ unkonventionelle Reaktionssysteme sind meist für organische Lösungsmittel beschrieben, aber auch andere unkonventionelle Medien können einphasig genutzt werden. Sie ermöglichen eine sehr gute Löslichkeit der organischen Substrate und Produkte, darüber hinaus erlauben sie einen geringeren präparativen Aufwand bei der Produktaufarbeitung (Pollard, 2008). Reaktionen, die in wässrigen Medien nicht durchgeführt werden können, bei denen z.B. in wässrigen Medien unerwünschte Nebenreaktionen auftreten (v.a. mit Hydrolyasen), können in wasserfreien unkonventionellen Medien möglich sein (Halling, 1987, Klibanov, 2001). In wasserfreien Medien weisen viele Enzyme eine erhöhte Rigidität auf, wodurch eine verbesserte Stabilität (auch Thermostabilität) erreicht werden kann, welche aber meist mit einer erheblichen Senkung der Aktivität im Vergleich zu wässrigen Systemen einhergeht (Griebenow *et al.*, 2001, Halling, 2004, Hutcheon *et al.*, 2000). Eine Regulation der Aktivität ist über die so genannte Wasseraktivität möglich. Die Wasseraktivität ist ein Maß für frei verfügbares Wasser. Sie ist definiert als der Partialdruck des Wassers über einem Material dividiert durch den Wasserdampfdruck über reinem Wasser (p_0) bei einer bestimmten Temperatur: Essentiell sind dabei die enzymgebundenen Wassermoleküle, welche eine gewisse Flexibilität erlauben und damit die Aktivität des Enzyms in solchen Systemen erst ermöglicht. Für eine gute Enzymaktivität und Stabilität muss die Wasseraktivität für jedes Lösungsmittel und Enzym eingestellt werden, um eine optimale Hydratisierung des Enzyms zu erzielen (Halling, 2004, Zaks und Klibanov, 1988). Wobei die optimale Hydratisierung von Enzym zu Enzym stark variieren kann. So benötigt Chymotrypsin für den Erhalt der katalytischen Aktivität nur etwa 50 Wassermoleküle pro Enzymmolekül (Zaks und Klibanov, 1984), während die Polyphenoloxidase ca.

$3,5 \cdot 10^7$ Wassermoleküle benötigt (Kazandjian und Klibanov, 1985). Ein geringer Anteil an Wasser ist also auch in diesen Systemen immer vorhanden, zumal auch bei der Lyophilisation der Enzyme das fest an das Enzym gebundene Wasser nicht entfernt werden kann. Deshalb werden sie auch als zweiphasige Systeme mit **sehr** geringem Wasseranteil angesehen (Halling, 1987). Dabei spielt die Zusammensetzung der wässrigen Komponente eine große Rolle, denn diese beeinflusst ebenfalls die Aktivität des Enzyms. Dies zeigen vor allem Beispiele mit Enzymen, die in Puffern mit verschiedenen pH-Werten lyophilisiert wurden und deren Aktivität in organischen Lösungsmittel abhängig von diesen pH-Werten variierten (Kazandjian und Klibanov, 1985, Krishna, 2002). Da das gebundene Wasser für die Aktivität der Enzyme zwingend notwendig ist, sind polare (hydrophile) organische Lösungsmittel in diesen Systemen weniger geeignet, denn sie neigen dazu dem Enzym das oberflächen-gebundene Wasser zu entziehen (Kijima *et al.*, 1999, Klibanov, 1997).

1.2.2 Reaktionssysteme mit wassermischbaren Kosolventien

Mit Wasser mischbare unkonventionelle Medien als Kosolventien, z.B. Ethanol, Polyethylenglycol (PEG) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) können ebenfalls zu einer Erhöhung der Substrat- oder Produktlöslichkeit führen, gleichzeitig können sie positiven Einfluss auf das Reaktionsgleichgewicht, die Aktivität, Stabilität und Selektivität von Enzymen haben (Castro und Knubovets, 2003). Der Zusatz von Kosolventien führt zu einer reduzierten Wasseraktivität, wobei die Hydrathülle welche das Enzym umgibt je nach Kosolventienkonzentration durch Moleküle des Solvents ausgetauscht wird (Castro und Knubovets, 2003, Khmelnitsky *et al.*, 1991b). Für die Aktivität des Enzyms ist dabei die tatsächliche Konzentration des gebundenen Wassers von Bedeutung und nicht der Wasseranteil im Medium. Bei geringen Kosolventienkonzentrationen kann eine optimale Hydratisierung des Enzyms erreicht werden und so zu höheren Aktivitäten und Stabilitäten (Kumar und Prakash, 2003) als in rein wässrigen Medien führen (Castro und Knubovets, 2003). Aber bei Erreichen einer kritischen Grenze, welche je nach Enzym und Kosolvents stark variiert, können dramatische Änderungen in der Proteinstruktur hervorgerufen werden und zur Denaturierung führen (Khmelnitsky *et al.*, 1991b). Bei multimeren Proteinen kann zusätzlich eine Anlagerung des Kosolvents an den meist hydrophoben Kontaktflächen der Monomere stattfinden, so dass eine korrekte Zusammenlagerung unmöglich ist (Kumar und Prakash, 2003). Daher ist der Einsatz von Kosolventien meist nur begrenzt möglich. Neben der Dehydratisierung des Enzyms können hydrophobe Wechselwirkungen der Kosolventien mit hydrophoben Aminosäureresten auftreten, welche sich im Zentrum des Enzyms zusam-

menlagern und so einen hydrophoben Kern bilden. Die native Faltung wird durch die Interaktion mit Kosolventmolekülen gestört und eine Denaturierung hervorgerufen, wobei das Verhalten einzelner Enzyme gegenüber den verschiedenen Lösungsmitteln kaum vorhersehbar ist (Castro und Knubovets, 2003). Versuche generelle Parameter zu bestimmen, wie z.B. Polarität oder Hydrophobizität des Kosolvents, führten bisher zu keinem Erfolg (Castro und Knubovets, 2003). Ein weiterer Nachteil für den Einsatz von Kosolventien, neben der begrenzten Konzentration und dem damit begrenzten Einsatz von hydrophoben Substraten, kann die unter Umständen recht aufwendige Produktreinigung sein (Eggers *et al.*, 1989).

1.2.3 Zweiphasensysteme

Eine weitere Anwendung ist die Biokatalyse in Zweiphasensystemen. Hier wird das Enzym und evt. benötigte Kofaktoren meist in einem wässrigen Medium gelöst (reaktive Phase), während das mit Wasser nicht oder nur gering mischbare unkonventionelle Medium als Reservoir (nicht reaktive Phase) für hohe Konzentrationen des Substrats und des Produkts dienen kann. Zweiphasensysteme sind meist für nicht wassermischbare organische Lösungsmittel beschrieben, aber auch ionische Flüssigkeiten können in Zweiphasensystemen verwendet werden (Kragl *et al.*, 2002). So können hohe Reaktionsraten und gute Produktausbeuten erzielt und einige der genannten Vorteile der unkonventionellen Medien genutzt werden, obwohl die Stabilität gegenüber einphasigen Systemen meist stark reduziert ist (Krishna, 2002). Diese Methode kann z.B. für die Fermentation (Malinowski, 2001) und gereinigte Enzyme genutzt werden welche keine oder nur sehr geringe Aktivitäten in wasserfreien Medien aufweisen (Straathof, 2003) oder eine hohe Sensibilität gegenüber den Reaktanden zeigen (Kim *et al.*, 2007). Da die organischen Substrate und Produkte bei guter Löslichkeit im unkonventionellen Medium, in der reaktiven Phase nur in geringer Konzentration vorliegen (Eggers *et al.*, 1989, Kim *et al.*, 2007). Funktion sowie Vor- und Nachteile von Zweiphasensystemen werden in den nächsten Kapiteln anhand der wässrig-organischen Zweiphasensysteme näher besprochen.

1.2.3.1 Wässrig-organische Zweiphasensysteme

Organische Lösungsmittel als unkonventionelle Medien sind in der Literatur am häufigsten beschrieben; alle anderen Systeme sind noch verhältnismäßig jung. Neben dem Einsatz von einphasigen Systemen inklusive wässrig-organischen Systemen und der Verwendung von

reinen organischen Lösungsmitteln (mit sehr geringem Wasseranteil Abb. 2, siehe Kapitel 1.2) finden Zweiphasensysteme mit größeren Wasseranteilen und mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmitteln Anwendung. Mikroemulsionen (Abb. 2 B) bilden aus makroskopischer Sicht eine homogene Mischung aus einer wässrigen Komponente, einer organischen Komponente und einem Tensid. Die Mischung der Komponenten führt zu einer stabilen Emulsion (Orlich und Schomaecker, 1999). Durch den amphiphilen Charakter des Tensids werden kleine wässrige Tropfen (Reverse Mizellen) von der organischen Phase abgeschirmt, in denen der Biokatalysator und benötigte Kofaktoren eingeschlossen werden. In diesen Systemen kann allerdings keine Phasentrennung erfolgen, was eine Produktabtrennung sowie die Rückgewinnung des Enzyms erschwert, zusätzlich können die Tenside einen negativen Einfluss auf die Stabilität von Enzymen besitzen (Carvalho und Cabral, 2000).

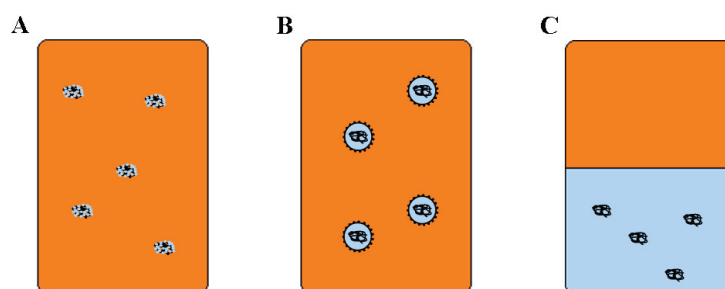


Abb. 2: Beispiele von Systemen für die Biokatalyse in organischen oder organisch-wässrigen Zweiphasensystemen. A) rein organische Systeme mit enzymgebundenen Wassermolekülen. B) stabile Mikroemulsion mit Reversen Mizellen, welche durch die Umlagerung von Wassertröpfchen durch Tenside gebildet werden. C) Zweiphasensystem mit umfangreicher wässriger Phase. Blau = Wasser/Puffer, rot = organisches Solvents.

Einfachere Zweiphasensysteme (Abb. 2C) bestehen aus einer umfangreichen wässrigen Phase und einer organischen Phase, welche durch nur eine Grenzfläche (Interphase) voneinander getrennt sind.

Das Reaktionsprinzip in solchen Zweiphasensystemen ist immer gleich (Abb. 3). Das Enzym und die hydrophilen Kofaktoren werden ausschließlich in der wässrigen Phase gelöst, während das hydrophobe Substrat in hohen Konzentrationen im organischen Lösungsmittel gelöst wird. Abhängig vom Verteilungskoeffizienten des Substrates in den beiden Phasen, diffundiert ein Teil in die wässrige Phase und kann dort von dem Biokatalysator zum entsprechenden Produkt umgesetzt werden. Je nach Löslichkeit des Produkts wird es aus der wässrigen Phase in die organische Phase extrahiert. Da das Substrat stetig umgesetzt wird, diffundiert es konstant in die wässrige Phase nach. Aufgrund der Beschränkung des

Massentransfers auf den Bereich der Interphase, wird ein solches System für Synthesereaktionen normalerweise kontinuierlich gemischt, um eine Emulsion zu bilden. So wird die gesamte Interphasenfläche vergrößert und der Massentransfer zwischen den Phasen verbessert. Zur Aufrechterhaltung der Emulsion ist allerdings ein hoher Energieeintrag notwendig.

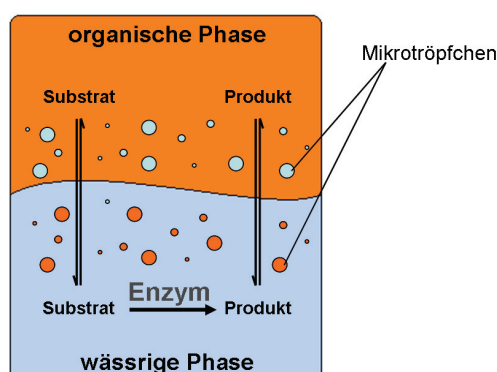


Abb. 3: Prinzip eines wässrig-organischen Zweiphasensystems. Die Mikrotröpfchen deuten die Bildung einer Emulsion aus den beiden Phasen an. Je nach Zusammensetzung können sich Wasser in Öl (W/O) Emulsionen bilden. Hier sind die Wassertröpfchen von der organischen Phase eingeschlossen. Umgekehrt können auch Öl in Wasser (O/W) Emulsionen entstehen, bei denen das organische Solvents von der wässrigen Phase umschlossen wird. Zur besseren Übersicht ist die Reaktion nur über die große Interphase dargestellt.

Abgesehen von Interphaseneffekten, welche zu einem späteren Zeitpunkt genauer besprochen werden, haben nur Komponenten einen direkten Einfluss auf Aktivität und Stabilität des Biokatalysators welche im wässrigen Medium vorliegen (Halling, 1987). Puffertyp und pH-Wert, Kofaktor-, Substrat- und Produktkonzentration sowie der Anteil im wässrigen Medium gelösten organischen Lösungsmittels sind von entscheidender Bedeutung. Die Gegenwart von organischen Lösungsmittelmolekülen im wässrigen Medium kann die Solvatisierung von Substraten, Produkten und Aminosäureseitenketten im aktiven Zentrum verändern und so die enzymatische Aktivität beeinflussen sowie die Gleichgewichtslage der Reaktion verschieben (Halling, 2004, Mozhaev *et al.*, 1989, Remy *et al.*, 1985). Auch direkte Interaktion zwischen Solvents und Enzym können zu einer Beeinflussung der Aktivität, Selektivität und Stabilität führen. Z.B. können Lösungsmittelmoleküle direkt im aktiven Zentrum binden und so als Inhibitoren wirken (Mattos und Ringe, 2001, Nakamura *et al.*, 1995).

Neben den direkten Einflüssen auf den Katalysator (Aktivität, Stabilität, Selektivität) müssen eine Reihe von Faktoren für die Wahl des organischen Lösungsmittels berücksichtigt werden. Das Lösungsvermögen, sowie der Verteilungskoeffizient bei den verschiedenen Lösungs-

mitteln ermöglichen die Kontrolle über die Konzentration der Substrate und Produkte in der reaktiven Phase und nehmen direkten Einfluss auf die Reaktionsrate sowie Substrat- oder Produktinhibierung bzw. Inaktivierung. Abhängig von der gelösten Substratkonzentration und dem Volumenverhältnis der beiden Phasen kann die Substratkonzentration in der reaktiven Phase über einen langen Zeitraum konstant gehalten werden. Bei guter Extraktion des Produkts aus der reaktiven Phase wird das Reaktionsgleichgewicht verschoben, was zu verbesserten Umsätzen und damit Produktausbeuten führen kann. Das Gleichgewicht, welches zwischen Substrat und Produkt in der organischen Phase erreicht werden kann, sollte hinsichtlich verbesserter Produktausbeuten nicht außer Acht gelassen werden. Besonders in industriell genutzten Prozessen spielen auch Kosten und Umweltverträglichkeit eine erhebliche Rolle. Bei flüssigen Substraten kann die organische Phase auch aus dem Substrat selbst bestehen (Carrea, 1984, Eggers *et al.*, 1989, Halling, 1987, Halling, 1990, Kim *et al.*, 2007). Dabei kann es vorkommen, dass das Produkt in der Substratphase nicht löslich ist, die Produktreinigung kann aber z.B. bei Präzipitation trotzdem recht einfach sein (Kühl *et al.*, 2007). Die Löslichkeit von Reaktanden sowie der Verteilungskoeffizient können heutzutage recht präzise berechnet werden (Halling, 1990, Peters *et al.*, 2007, Peters *et al.*, 2008, Spiess *et al.*, 2008), aber die Effekte auf die Enzyme selbst sind nur schwer vorhersagbar.

Generell zeigen Biokatalysatoren welche in wässrigen Medien aktiv sind, auch Aktivität in den besprochenen Zweiphasensystemen (Straathof, 2003). Lipasen nehmen eine Sonderstellung ein, da sie erst durch den Kontakt an der Interphase aktiviert werden. Deshalb sind Systeme mit großen Interphasenflächen für Lipasen besonders geeignet. Zweiphasensysteme können für gereinigte Enzyme oder Ganzzell-Biokatalysatoren verwendet werden. Durch die Möglichkeit höhere Substratkonzentrationen einzusetzen, können bessere Reaktionsraten, Umsätze und Ausbeuten bei gleichzeitiger Verringerung des Reaktionsvolumens erzielt werden (Carrea, 1984, Halling, 1987, Halling, 1990). Wenn nötig können Substrat- und Produktkonzentration in der reaktiven Phase gering gehalten werden, z.B. bei großer Sensibilität der Katalysatoren gegenüber einem der beiden Reaktanden (Carrea, 1984, Kim *et al.*, 2007). Des Weiteren können hydrophile Kofaktoren eingesetzt werden und die Kofaktoregeneration parallel betrieben werden (Carrea, 1984). Nach Phasentrennung (dies gilt nicht für Mikroemulsionen) kann das Produkt in der Regel aus der organischen Phase gewonnen werden, während der Katalysator in der wässrigen Phase zurückgehalten wird (Carrea, 1984, Halling, 1987, Halling, 1990). Aber in den meisten Fällen ist ein negativer Effekt auf die

Stabilität von Enzymen in solchen Zweiphasensystemen beobachtet worden, was hauptsächlich auf Effekte der Interphasenfläche zurückgeführt wird.

1.2.3.1.1 Stabilität von Enzymen in wässrig-organischen Zweiphasensystemen

Neben den Faktoren, welche die Enzymstabilität und Aktivität in wässrigen Puffern beeinflussen (pH, Temperatur, Ionenstärke usw.), sind in wässrig-organischen Zweiphasensystemen auch Enzym-inaktivierende Interaktionen mit den verwendeten organischen Lösungsmitteln zu beobachten. Dabei wird unterschieden zwischen der molekularen Toxizität, welche auf die in der wässrigen Phase gelösten Lösungsmittelmoleküle zurückgehen und die Grenzflächentoxizität welche durch Interaktionen mit der hydrophoben Grenzfläche (Interphase) zwischen den beiden Phasen verursacht wird (Vermue und Tramper, 1995).

Die in der wässrigen Phase gelösten Lösungsmittelmoleküle können z.B. mit hydrophoben Aminosäureseitenketten interagieren, welche Kontaktflächen für die Untereinheiten oder den hydrophoben Kern eines Enzyms bilden (Mattos und Ringe, 2001, Ross *et al.*, 2000a). Durch diese Wechselwirkungen sind strukturelle Umlagerungen denkbar, welche zu einer reversiblen oder irreversiblen Inaktivierung des Enzyms führen. Der log *P*-Wert (Verteilungskoeffizient einer gegebenen Substanz in einem n-Oktanol/Wasser Zweiphasensystem) ist ein Maß für die Polarität eines Lösungsmittels und wird oft als ein wichtiger Indikator für die Stabilität von Enzymen gegenüber den organischen Solventen angesehen (Drauz und Waldmann, 2002, Faber, 1994), obwohl in einigen Arbeiten ein einfacher Zusammenhang zwischen dem log *P*-Wert des Lösungsmittels und der Stabilität von Enzymen nicht bestätigt werden konnte (Ghatorae *et al.*, 1994a, Ghatorae *et al.*, 1994b, Khmelnitsky *et al.*, 1991a, Khmelnitsky *et al.*, 1991b, Ross *et al.*, 2000a, Ross *et al.*, 2000b). Eine molekulare Toxizität durch eine Dehydratisierung des Enzyms, wie beim Einsatz von Kosolventien beschrieben (Kapitel 1.2.2) liegt nicht vor, die notwendigen Grenzkonzentrationen werden mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmitteln nicht erreicht (Khmelnitsky *et al.*, 1991b).

Eine allgemein anerkannte Hypothese zur Interphaseninaktivierung ist z.B. von Baldascini und Janssen beschrieben worden (Baldascini und Janssen, 2005) (siehe Abb. 4):

1. Durch Interaktion hydrophober Enzymbereiche mit der hydrophoben Oberfläche an der Interphase kommt es zu einer reversiblen Adsorption von Enzymmolekülen an die Interphase. Hierbei findet bereits eine geringe strukturelle Veränderung statt, welche

zu einer Inaktivierung führen kann, die aber noch reversibel sein kann. Durch die Anlagerung werden Wassermoleküle an der Grenzfläche verdrängt, was aus thermodynamischer Sicht sehr günstig ist und die treibende Kraft für die Adsorption darstellt (Ghatorae *et al.*, 1994a, Ross *et al.*, 2000b).

2. Bei längerer Adsorption der Enzyme an der Interphase kann es durch die thermodynamischen Kräfte zu weiteren Umfaltungen kommen, was zur Exposition des hydrophoben Enzymkerns an der Grenzfläche führen kann.
3. Die Konformationsänderungen sind dann so erheblich, dass auch nach Desorption das Enzymmolekül seine aktive Konformation nicht wiedererlangen kann. Die Desorption von der Interphase scheint dabei ein weniger spontaner Prozess als die Adsorption zu sein und bildet deshalb den geschwindigkeitslimitierenden Schritt bei der Interphasen-inaktivierung.
4. Aufgrund der exponierten hydrophoben Enzymbereiche kommt es zur Aggregation der desorbierten Enzymmoleküle, in deren Folge meist eine Enzympräzipitation einhergeht (Ghatorae *et al.*, 1994b, Ross *et al.*, 2000b).

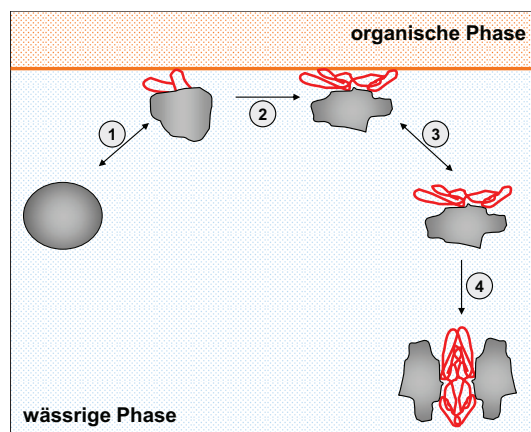


Abb. 4: Inaktivierung von Enzymen an der Grenzfläche in wässrig organischen Zweiphasensystemen. 1. Reversible Adsorption, 2. irreversible strukturelle Umlagerung, 3. reversible Desorption, 4. irreversible Aggregation und Präzipitation (nach Baldascini und Janssen, 2005). Überwiegend hydrophile Enzymbereiche sind grau, überwiegend hydrophobe Bereiche sind rot dargestellt.

Die Sensitivität einzelner Enzyme gegenüber Interphaseneffekten kann sehr unterschiedlich ausgeprägt sein und ist abhängig vom gewählten Solvents. In Einzelfällen kann eine, wenn auch teilweise nur sehr schwache Korrelation zwischen $\log-P$ Wert, Oberflächenspannung, Hildebrandt Parameter (beschreibt die Mischbarkeit von Lösungsmitteln und dient als Maß der Polarität einer Substanz) oder funktionellen Gruppen des Lösungsmittels und der Enzym-

inaktivierung beobachtet werden (Ghatorae *et al.*, 1994a, Ghatorae *et al.*, 1994b, Ross *et al.*, 2000a, Ross *et al.*, 2000b). Enzymeigenschaften wie z.B. Größe (je größer desto umfangreicher die möglichen Konformationsänderungen), Flexibilität (je flexibler desto geringer die Entfaltungsenergie), die Gesamthydrophobizität (je hydrophober desto mehr Reste können mit der Interphase interagieren) können ebenfalls nur bedingt in Korrelation mit der Interphaseninaktivierung gebracht werden (Ghatorae *et al.*, 1994b, Ross *et al.*, 2000a, Ross *et al.*, 2000b). In jedem Fall korreliert die Inaktivierung positiv mit der Interphasenfläche: je größer die Interphasenfläche, desto höher die Inaktivierungsrate (Baldascini und Janssen, 2005, Ghatorae *et al.*, 1994a, Ghatorae *et al.*, 1994b, Ross *et al.*, 2000a, Ross *et al.*, 2000b). Das unterschiedliche Verhalten einzelner Enzyme macht die Voraussage für das Verhalten eines Enzyms in Gegenwart eines organischen Lösungsmittels anhand weniger Parameter unmöglich. Vielmehr muss eine Vielzahl an Protein- und Lösungsmitelegenschaften berücksichtigt werden, welche vermutlich in Wechselwirkung miteinander stehen. Zum Beispiel können die molekulare Toxizität und Grenzflächentoxizität nicht unabhängig voneinander betrachtet werden. Zudem hat auch der pH-Wert in der wässrigen Phase Einfluss auf die Inaktivierungsrate, so dass die Wahl des organischen Lösungsmittels und geeigneter Reaktionsparameter für jedes Enzym ermittelt werden müssen.

Eine verbesserte Stabilität, kann also durch die Wahl des Lösungsmittels oder geeigneter Pufferbedingungen erreicht werden. Aber auch Zusätze von stabilisierenden Komponenten, wie Glycerin, Trehalose oder BSA (Serum Albumin) können zu einer Stabilisierung führen (Fagain, 1995, Pazhang *et al.*, 2006, Torchilin und Martinek, 1979). Weitere Strategien sind die Immobilisierung durch Bindung der Enzyme an verschiedene Trägermaterialien oder der Einschluss von Enzymen in polymere Matrices oder Membranen; kovalente chemische Modifikation von Aminosäureresten an der Enzymoberfläche; sowie Veränderungen an der Primärstruktur des Enzyms durch zielgerichtete Mutagenesen oder gerichtete Evolution (Kumar und Prakash, 2003).

1.3 Bedeutung und Synthese chiraler 2-Hydroxyketone

2-Hydroxyketone bilden eine Gruppe vielseitig einsetzbarer Bausteine für die Synthese bioaktiver Moleküle in der Pharmazie und in der Pflanzenschutz-Industrie (Ward und Singh, 2000). Mittels enantioselektiver Reduktion oder reduktiver Aminierung der Ketogruppe können chirale Diole und Aminoalkohole gewonnen werden, welche wiederum bei der

Synthese von Liganden und chiralen Auxilaren eingesetzt werden (Kihumbu *et al.*, 2002, Stillger, 2004).

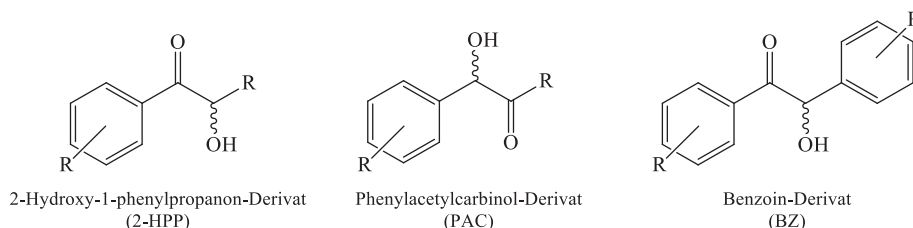


Abb. 5: Strukturen aromatischer Hydroxyketone. Hydroxyketone können an den aromatischen Ringen oder im aliphatischen Bereich substituiert vorliegen, gekennzeichnet durch einen allgemeinen Rest (R).

2-Hydroxy-1-phenylpropanon-Derivate (HPP) dienen z.B. als Vorstufen für Nitidanin (Lebererkrankungen, Malaria), (-)-Cytosazon (Antialergika), 5-Methoxyhydnocarpin (Inhibitor mikrobieller *multidrug pumps* - welche Antibiotika-Resistenzen hervorruft) und Wirkstoffen in Antidepressiva (1555U88, Bupropion) (Fang *et al.*, 2000, Flora *et al.*, 1998, Kakeya *et al.*, 1999, Morazzoni und Bombardelli, 1965, Stermitz *et al.*, 2000). Auch die Fungizide Sch 42427/Sm 9164 und ER-303465/Ro 09-335 werden aus einem HPP-Derivat als Vorläufer gewonnen (Gala und DiBenedetto, 1997, Gala *et al.*, 1996a, Gala *et al.*, 1996b, Kitazaki *et al.*, 1999). Phenylacetylcarbinol (PAC) ist z.B. die Vorstufe für Ephedrin oder Pseudoephedrin, welche unter anderem bei Bronchialerkrankungen, asthmatischen Symptomen, Narkolepsie oder Hypotonie eingesetzt wurden oder zum Teil noch eingesetzt werden.

Symmetrische Benzoinen werden schon seit längerem auf chemischem Wege hergestellt und stehen so für pharmazeutische Produkte zur Verfügung (Harris *et al.*, 1992, Khalifa *et al.*, 1991, Meanwell *et al.*, 1992, Procopiou *et al.*, 1993, Sheehan und Guziec, 1972, Zaks und Klivanov, 1986). Dagegen ist die chemische Synthese von gemischten Benzoinen, speziell in enantiomerenreiner Form, wenig verbreitet. Die α -Hydroxycarbonyl-Einheit bietet zahlreiche synthetische Möglichkeiten, z.B. als Baustein für pharmakologisch aktive Substanzen oder als photolabile Schutzgruppe. Bei pharmakologisch wirksamen Verbindungen, für deren Synthese unsymmetrische Benzoinen genutzt wurden, handelt es sich meist um Entzündungshemmer (Antolini *et al.*, 1999, Barta *et al.*, 1998, Bender *et al.*, 1985, Lantos *et al.*, 1984, Leblanc *et al.*, 1995). Doch trotz der vorhandenen biologischen Wirksamkeit wird bisher keine der Verbindungen zur industriellen Herstellung eines pharmazeutischen Präparats eingesetzt. In der Lebensmittelindustrie dient Benzoin als Antioxidans (Viscidi *et al.*, 2004).

Für die Synthese von 2-Hydroxyketonen werden sowohl chemische als auch biologische Methoden genutzt. Bei chemischen Verfahren ist beispielsweise die enantioselektive Oxidation von Enolethern weit verbreitet (Adam *et al.*, 1998, Solladié-Cavallo *et al.*, 2003). Dabei kommen elektrophile Sauerstoffdonoren, wie zum Beispiel Osmiumtetroxid in Gegenwart chiraler Auxillare (*ee* 86-95%) (Hashiyama *et al.*, 1992) oder Mangan-(III)-Selen-Komplexe (*ee* 11-89%) (Adam *et al.*, 1996, Adam *et al.*, 1998) zum Einsatz. Des Weiteren wurden oxidative Prozesse, wie die α -Hydroxylierung von Ketonen oder Keto-Hydroxylierung von Olefinen beschrieben (Plietker, 2005). Mildere Reaktionsbedingungen, sind durch den Einsatz von Katalysatoren wie Cyanidionen oder bizyklischer Thiazoliumsalze möglich. Die Synthese beruht auf einer Aldehyd-Verknüpfung unter Ausbildung einer C-C-Bindung im Sinne einer Benzoinkondensation und es können Enantiomerenüberschüsse (*ee*) von bis zu 95% erreicht werden (Baburina *et al.*, 1998, Breslow, 1957, Enders *et al.*, 1996, Enders und Kallfass, 2002, Knight und Leeper, 1998).

Für die chemische Synthese sind oft Mehrschrittsynthesen notwendig, dies kann zu verringerten Ausbeuten und zu Abfallprodukten führen. Des Weiteren sind hohe Enantioselektivitäten nur selten zu erreichen (Hachisu *et al.*, 2003, Hoyos *et al.*, 2010). Eine Alternative bietet der Einsatz von Biokatalysatoren wie z.B. die NAD-abhängige Glyceroldehydrogenase (GDH, EC 1.1.1.6) aus *Enterobacter aerogenes* oder *Cellulomonas* Spezies. Das Enzym ermöglicht die Synthese von chiralen 2-Hydroxyketonen entweder durch die kinetische Racematspaltung von 2-Hydroxyketonen durch *R*-enantioselektive Reduktion oder durch stereoselektive Oxidation von cis-1,2-Diolen (*ee* 99%) (Lee und Whitesides, 1986). Auch Lipasen finden bei der Synthese von chiralen 2-Hydroxyketonen Anwendung. Dabei ist sowohl eine Racematspaltung durch enantioselektive Acylierung von Hydroxyketonen als auch eine selektive Hydrolyse der acylierten Spezies möglich (*ee* 66-96%) (Adam *et al.*, 1999). Eine weitere wichtige Gruppe von Biokatalysatoren stellen die Thiamindiphosphat-abhängigen Enzyme dar. Sie ermöglichen durch die C-C-Verknüpfung ausgehend von kostengünstigen Aldehyden den Zugang zu einer Vielzahl enantiomerenreiner HPP-, PAC- sowie symmetrischen und gemischten Benzoin-Derivaten, mit ausgezeichneten Enantiomerenüberschüssen von bis zu 99,9% (Hoyos *et al.*, 2010). Aufgrund der nur geringen Löslichkeit der aromatischen Substrate und Produkte wird die enzymatische Synthese von 2-Hydroxyketonen in einer Reihe von unkonventionellen Medien untersucht (Demir *et al.*, 2001, Demir *et al.*, 2002, Hildebrand *et al.*, 2007, Janzen *et al.*, 2006, Kokova, 2009, Kokova *et al.*, 2009, Kühl, 2009, Kühl *et al.*, 2007, Mikolajek *et al.*, 2007, Mikolajek *et al.*, 2009,

Rosche *et al.*, 2005a, Schmidt, 2008, Schmidt *et al.*, 2009, Stillger, 2004, Stillger *et al.*, 2006, van den Wittenboer *et al.*, 2009, Zavrel *et al.*, 2008).

1.4 Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme

Thiamindiphosphat (ThDP)-abhängige Enzyme spielen eine wichtige Rolle im Metabolismus von Organismen (z.B. Pentose-Phosphat-Weg, Zitrat-Zyklus) und können eine Vielzahl von Reaktionen katalysieren. Durch den Kofaktor ThDP erhalten sie die Fähigkeit zur Spaltung und zur Knüpfung von C-C-, C-S-, C-N- und C-P-Bindungen (Frank *et al.*, 2007, Pohl *et al.*, 2004). Neben ihrer physiologischen (natürlichen) Aktivität katalysieren sie eine Reihe von Nebenreaktionen. Unter anderem können sie die nicht-oxidative und oxidative Decarboxylierung von 2-Ketosäuren, die Spaltung von C-C-Bindungen sowie die Carboligation von Aldehyden katalysieren (Sprenger und Pohl, 1999). Vor kurzem konnte für ein ThDP-abhängiges Enzym, die Acetylacetoinsynthase (kein Eintrag in der Proteindatenbank) aus *Bacillus stearothermophilus*, sogar die Kondensation von zwei Diketonen zu einem α -Hydroxy-1,3-diketon nachgewiesen werden (Giovannini *et al.*, 2010). Generell wird die Klasse der ThDP-abhängigen Enzyme in zwei Hauptgruppen unterteilt, solche mit Transferaseaktivität (Transfer funktioneller Gruppen) und solche mit Decarboxylaseaktivität (Abspaltung von CO₂) (Frank *et al.*, 2007). Unter anderen werden folgende Enzyme zur Klasse der ThDP-abhängigen Enzyme gezählt: Pyruvatoxidase (EC 1.2.3.3), 2-Ketosäuredehydrogenase (EC 1.2.4.X), Pyruvatsynthase (EC 1.2.7.1), Transketolase (EC 2.2.1.3), Acetolactatsynthase (EC 2.2.1.6), 1-Deoxyxylulose-5-phosphatsynthase (EC 2.2.1.7), Sulfoacetaldehydtransferase (EC 2.3.3.15), N²-2-Carboxyethylargininsynthase (EC 2.5.1.66), Carboxylyasen (EC 4.1.1.X), Glyoxylatcarboligase (EC 4.1.1.47) und die Benzaldehydlyase (EC 4.1.2.38) (Frank *et al.*, 2007, Pohl *et al.*, 2004).

Eine umfangreiche Übersicht über alle bekannten ThDP-abhängige Enzyme sowie veröffentlichte Strukturen und Funktionen kann in der neuen Datenbank: „*Thiamine diphosphate dependent Enzyme Engineering Database*“ (TEED: <http://www.teed.uni-stuttgart.de>) eingesehen werden (Widmann *et al.*, 2010).

1.4.1 Der Kofaktor Thiamindiphosphat (ThDP)

Wie bereits dem Namen zu entnehmen ist, benötigen ThDP-abhängige Enzyme den Kofaktor Thiamindiphosphat (ThDP). Thiamin (Vitamin B1) ist ein Bestandteil vieler pflanzlicher

Gewebe, wie z.B. Keimen oder Getreideschalen. In tierischen Geweben liegt es überwiegend als Thiamindiphosphat vor (Pohl *et al.*, 2002).

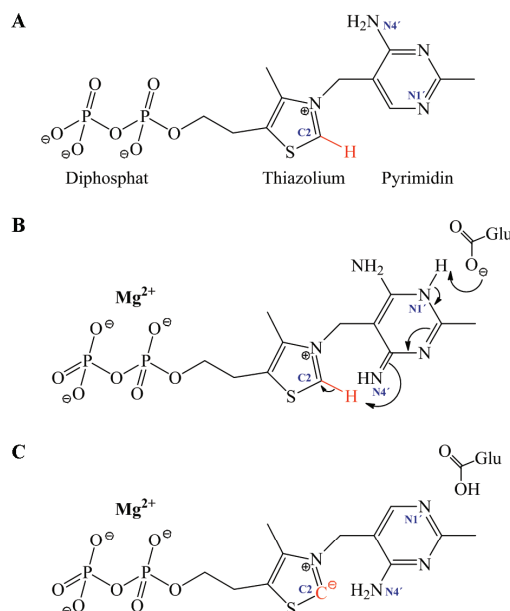


Abb. 6: Chemische Strukturen des ThDPs (nach Frank *et al.*, 2007). A: ThDP in Lösung. B: Enzym-gebundenes ThDP in der typischen V-Konformation, welche durch Annäherung des N4'-Atoms des Pyrimidinrings an das C2-Atom des Thiazoliumrings entsteht. Das Aminopyrimidin selbst liegt in der Imino-Form vor. Das C2-Proton wird zunächst auf das N4'-Atom und anschließend auf einen konservierten Glutamatrest (Glu) übertragen. C: Aktive Ylid-Form.

ThDP besteht aus drei Einheiten, einem 4'-Aminopyrimidin (im folgenden Pyrimidin), einem Thiazoliumring und einem Diphosphat (Abb. 6 A). Die katalytische Aktivität geht vom C2-Atom des Thiazoliumrings aus. Durch die Deprotonierung am C2-H, wird das ThDP in die katalytisch aktive Ylid Form überführt, wobei das C2 ein nukleophiles Zentrum bildet (Nemeria *et al.*, 2009). In wässriger Lösung ist die Azidität des Thiazoliums aber nur sehr gering, so dass kaum aktives ThDP vorliegt (Breslow, 1958). Im aktiven Zentrum eines Enzyms, wird das ThDP über den Diphosphat-Rest gebunden, zweiwertige Kationen wie Mg²⁺ oder Ca²⁺ dienen hierbei als Anker. Die Kationen selbst werden über das hoch konservierte Bindemotiv Gly-Asp-Gly gebunden (Hawkins *et al.*, 1989, Nemeria *et al.*, 2009). Bei der Bindung im aktiven Zentrum, wird durch eine hydrophobe Seitenkette im Bereich des Thiazoliumrings die typische V-Konformation des ThDP vermittelt (Jordan *et al.*, 2002, Pohl *et al.*, 2009, Shin *et al.*, 1977). Hierbei wird das N4' der schwachen Base Pyrimidin in die unmittelbare Nähe zum C2 des Thiazoliumrings gebracht. Diese Nähe ermöglicht einen

Protonentransfer vom C2 zum N4', welcher an die Carboxylgruppe eines hochkonservierten Glutamat-Restes, in Abstand einer Wasserstoffbrückenbindung zum N1' des Pyrimidinrings, abgeleitet wird. Das Thiazolium liegt nun in der aktivierten Ylid-Form vor, während das Pyrimidin in der Imino-Form vorliegt (Abb. 6 B-C) (Kern *et al.*, 1997, Shaanan und Chipman, 2009). Vermutlich vermittelt die unpolare Umgebung des aktiven Zentrums zusätzlich die notwendige Azidität des Thiazoliums um die Deprotonierung durch die schwache Base Pyrimidin einzuleiten (Shaanan und Chipman, 2009). Eine ähnliche Struktur konnte in fast allen ThDP-abhängigen Enzymen gefunden werden. Bisher ist nur eine Ausnahme bekannt, die Glyoxylatcarboligase (GCL). Diese besitzt keinen Glutamat-Rest in der Nähe des N1'. Es wird vermutet, dass die besonders unpolare Umgebung im aktiven Zentrum der GCL für eine ausreichende Azidität des Thiazoliums sorgt und somit zur Deprotonierung führt (Shaanan und Chipman, 2009). Eine weitere wichtige Eigenschaft, welche zu einer Beschleunigung der Reaktion führt, ist die Positionierung des Substrats in optimalen Abstand zum ThDP, durch das aktive Zentrum (Kluger und Tittmann, 2008).

1.4.2 Reaktionszyklus ThDP-abhängiger Enzyme

Die Katalyse durch Enzyme, die ThDP als Kofaktor nutzen, läuft vermutlich stets nach dem gleichen Mechanismus ab, welcher hier zuerst am Beispiel der Benzoinkondensation erläutert werden soll (Pohl *et al.*, 2002, Schellenberger, 1998).

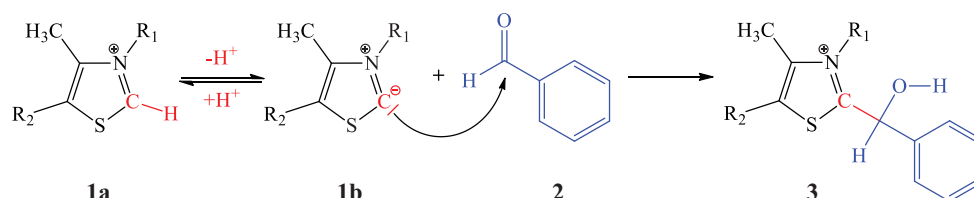


Abb. 7: Nukleophiler Angriff des ThDP an den Carbonyl-Kohlenstoff von Benzaldehyd.

Nach Deprotonierung des C2-Atoms am Thiazoliumring (**1a**), liegt an diesem Kohlenstoff eine negative Partialladung vor und die mesomeriestabilisierte Ylid-Form (**1b**) kann einen nukleophilen Angriff auf die Carbonylgruppe des Donorbenzaldehyds (**2**) ausführen, so findet eine Bindung des Substrates an das ThDP statt und das Hydroxybenzyl-ThDP (**3**) wird gebildet.

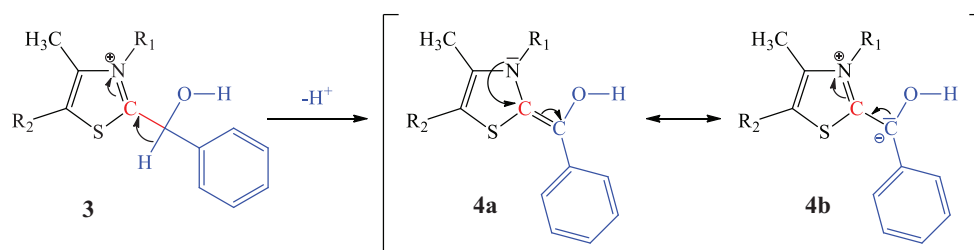


Abb. 8: Umpolung des Carbonyl-Kohlenstoffs unter Entstehung eines Enamins **4a** Carbanions **4b**.

Durch Abspaltung eines Protons entsteht das Enamin-Carbanion (**4a**, **4b**) mit dem „aktivierten Aldehyd“. Die Reaktivität des ehemals elektrophilen Carbonyl-Kohlenstoffs wurde zu nukleophil umgepolt. Durch die nun vorliegende negative Partialladung am „aktivierten Aldehyd“, kann ein weiterer nukleophiler Angriff auf einen Akzeptoraldehyd erfolgen und es entsteht ein Benzoin-ThDP Intermediat (**5**).

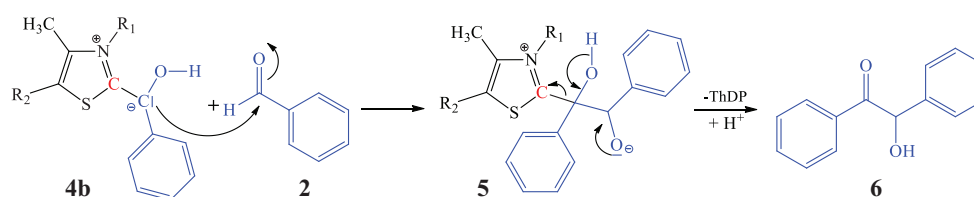


Abb. 9: Nukleophiler Angriff an den Carbonyl-Kohlenstoff von Benzaldehyd, Bildung von Benzoin.

Unter Rückbildung des ThDPs entsteht ein Benzoinmolekül (**6**). Nach Abspaltung des ThDP, liegt es in seiner Ylid-Form vor und kann rezykliert werden. Bei der Bildung von 2-Hydroxyketonen wird zwischen dem Donor- und dem Akzeptoraldehyd unterschieden. Der Donoraldehyd bindet zuerst an das ThDP und bildet so das Hydroxybenzyl-ThDP (Abb. 7). Der Akzeptoraldehyd bindet anschließend an das entstandene Carbanion (Abb. 9). Bei unterschiedlichen Aldehyden bestimmen die sterischen Eigenschaften des aktiven Zentrums, welcher Aldehyd als Donor und welcher als Akzeptor favorisiert wird. Die asymmetrische Synthese von 2-Hydroxyketonen wird in einer Reihe von Publikationen ausführlich diskutiert (Demir *et al.*, 2001, Demir *et al.*, 2002, Dünkeltmann *et al.*, 2002, Dünnwald *et al.*, 2000, Gocke *et al.*, 2007, Iding *et al.*, 2000, Lingen *et al.*, 2002).

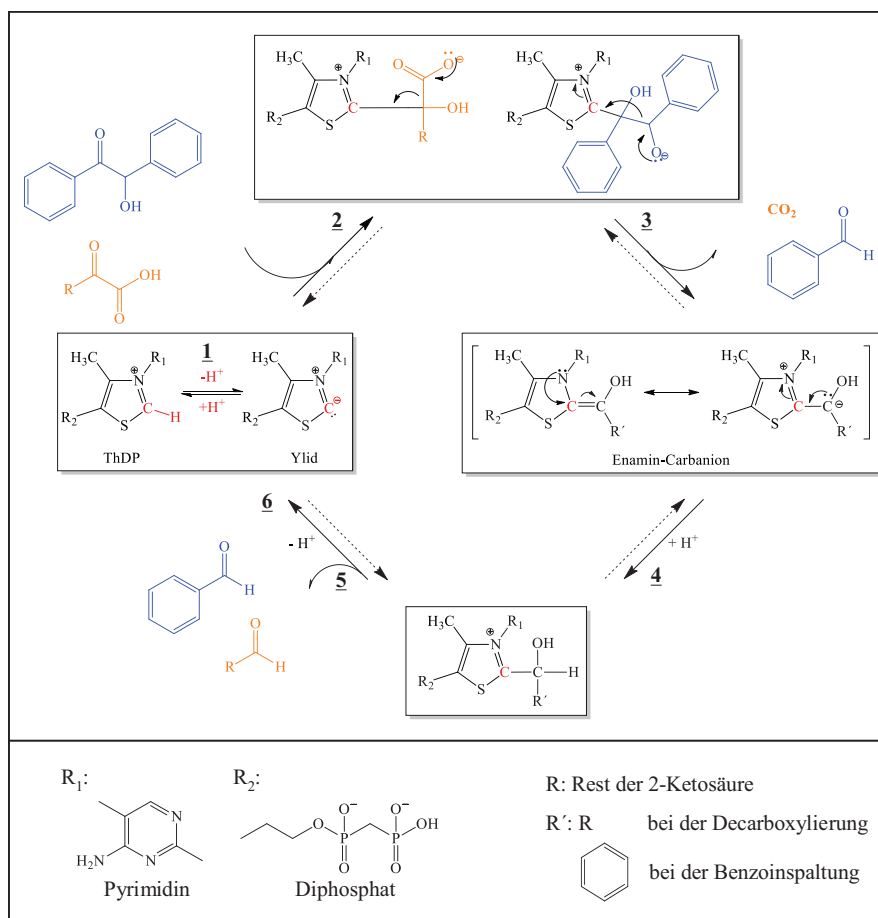


Abb. 10: Allgemeiner ThDP-Reaktionsmechanismus (nach Pohl *et al.*, 2002, Saehuan *et al.*, 2007, Siegert *et al.*, 2005). Die Decarboxylierung sowie die Benzoinspaltung sind mit durchgezogenen Pfeilen markiert. Die Benzoinkondensation ist mit gestrichelten Pfeilen markiert (eine Carboxylierung mittels Ligation von CO_2 an das Enamin-Carbanion findet nicht statt). Blau: Benzoinspaltung. Rot: Decarboxylaseaktivität. Nukleophiler Angriff des Ylids (**1**) auf die Ketogruppe einer 2-Ketosäure oder eines Benzoins und Bildung eines ThDP-Substrat-Intermediates (**2**). Das Enamin-Carbanion entsteht durch Abspaltung von CO_2 oder Benzaldehyd (**3**). Durch eine Protonierung des Enamin-Carbanions (**4**), eine darauf folgende Abspaltung eines freien Aldehyds (**5**) und eine Deprotonierung (**6**) kann das ThDP regeneriert werden. Nach der Abspaltung des 2-Hydroxyketons liegt das ThDP in der Ylid-Form vor und wird so rezykliert.

Die Lyasereaktion beinhaltet die gleichen Intermediate, wie die Ligasereaktion. Die meisten ThDP-abhängigen Enzyme katalysieren die Decarboxylierung von z.B. 2-Ketosäuren. Zur Spaltung von Benzoinen ist bisher nur die Benzaldehydlyase (BAL) aus *Pseudomonas fluorescens* fähig (Müller *et al.*, 2009). Im in Abb. 10 dargestellten Reaktionsmechanismus wird vorwiegend auf die Lyasereaktion der Decarboxylierung und der Benzoinspaltung eingegangen. Der Katalysezyklus beginnt mit der Deprotonierung des ThDPs am C2-Atom des Thiazoliumrings (**1**). So wird das Molekül in die aktive Ylid-Form überführt (Breslow,

1957, Kern *et al.*, 1997). Das Ylid kann nun eine 2-Ketosäure oder ein 2-Hydroxyketon (z.B. Benzoin) nukleophil angreifen (2). Das resultierende instabile Zwischenprodukt reagiert anschließend im Falle der Decarboxylierung unter Abspaltung eines CO₂-Moleküls und im Falle der Benzoinspaltung unter Freisetzung eines Benzaldehyd-Moleküls zu einem Enamin-Carbanion (3), das historisch auch als „aktives Aldehyd“ bezeichnet wird. Die Protonierung des Enamin-Carbanions führt zu einem hydroxylierten ThDP-Intermediat (4). Die anschließende Freisetzung des Aldehyds (5) und eine weitere Deprotonierung führen zur Regeneration des ThDPs (6). Nach Decarboxylierung und Benzoinspaltung (3) kann auch eine anschließende Addition des „aktiven Aldehyds“ an einen Akzeptoraldehyd und damit die Freisetzung eines 2-Hydroxyketons erfolgen. D.h. ist der Akzeptor nach der Decarboxylierung (oder 2-Hydroxyketonspaltung) ein Proton, wird anschließend ein Aldehyd frei, ist der Akzeptor ein Aldehyd, erfolgt eine Carboligation und ein 2-Hydroxyketon wird gebildet.

Die Reaktionsmechanismen vieler ThDP-abhängiger Enzyme wurden bereits, z.B. mit Hilfe von kinetischen Studien, Elektronenspinresonanz-Spektroskopie sowie Kristallstrukturanalysen mit den Reaktanden untersucht und können in einer Reihe von Artikeln eingesehen werden (Frank *et al.*, 2007, Giovannini *et al.*, 2010, Jordan, 2003, Nemeria *et al.*, 2009, Shaanan und Chipman, 2009, Siegert *et al.*, 2005, Tittmann, 2009).

1.4.3 Struktur ThDP-abhängiger Enzyme

Interessanterweise zeigen ThDP-abhängige Enzyme, trotz vieler Ähnlichkeiten im Katalysemechanismus, nur eine geringe Sequenzähnlichkeit. Im Gegensatz dazu sind die Tertiärstrukturen sehr ähnlich (Frank *et al.*, 2007). Derartige Unterschiede sind für Enzyme, die evolutiv weit voneinander entfernt sind, nicht ungewöhnlich. Vermutlich hat sich der ThDP-bindende Bereich, mittels divergenter Evolution, aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt (Frank *et al.*, 2007). Dies erklärt auch die hoch konservierte Region im aktiven Zentrum mit der Aminosäuresequenz Gly-Asp-Gly-(X)₂₅₋₃₀-Asn (Duggleby, 2006, Hawkins *et al.*, 1989, Reynen und Sahm, 1988), welche als Liganden für die Bindung eines Magnesiumions fungieren und so die Bindung des ThDP über die Diphosphatgruppe sicherstellen (Jordan *et al.*, 2002).

ThDP-abhängige Enzyme sind immer Oligomere, wobei das Dimer die kleinste aktive Assoziationsform darstellt. Im Folgenden werden strukturelle Aspekte der Decarboxylase-(DC) Familie (Widmann *et al.*, 2010) genauer diskutiert. Jede Polypeptidkette ist in drei

Domänen mit α/β -Topologie unterteilt (Costelloe *et al.*, 2008, Frank *et al.*, 2007). Zwei der Domänen, sind an der Bindung der Kofaktoren ThDP und Mg^{2+} beteiligt. Wobei die Bindung stets an der Grenzfläche von zwei Untereinheiten erfolgt (Müller *et al.*, 1993, Pohl *et al.*, 2009). In Abb. 11 ist die Domänenanordnung beispielhaft in der Kristallstruktur der Benzoylformiatdecarboxylase (BFD) aus *Pseudomonas putida* dargestellt (Polovnikova *et al.*, 2003).

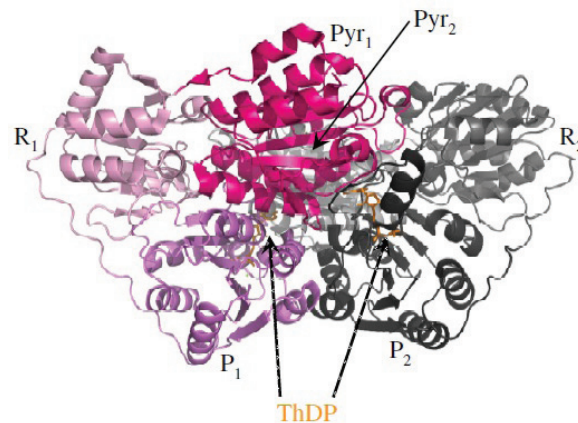


Abb. 11: Anordnung der Domänen in ThDP-abhängigen Enzymen der Decarboxylasefamilie. Jeweils eine Pyrimidin (Pyr)-, mittlere (regulatorische, R)- und Pyrophosphat (P)-Domäne bilden ein Monomer. Pyr1 (pink), R1 (rosa) und P1 (violett) = Monomer 1; Pyr2 (hellgrau), R2 (mittelgrau) und P2 (dunkelgrau) = Monomer 2. ThDP-Moleküle sind in orange dargestellt und an der Grenzfläche der Pyr- und P-Domänen des jeweilig anderen Monomers lokalisiert. Diese Abbildung wurde auf der Basis der BFDwt-Kristallstruktur (PDB: 1MCZ) (Polovnikova *et al.*, 2003) mit dem Programm PyMOL erstellt.

Die N-terminale Pyr-Domäne (α -Domäne) des Monomers 1 interagiert mit dem Pyrimidin des ThDP (Struktur ThDP siehe Abb. 6), die C-terminale P-Domäne (γ -Domäne) des Monomers 2 mit der Phosphatgruppe. Umgekehrt interagieren die Pyr-Domäne des Monomers 2 und die P-Domäne des Monomers 1 mit einem weiteren ThDP Molekül (Duggleby, 2006, Lindqvist *et al.*, 1992). So bilden zwei identische Monomere ein katalytisch aktives Dimer mit zwei aktiven Zentren. Die mittlere R-Domäne (β -Domäne) ist nicht an der Interaktion mit dem Kofaktor beteiligt (Duggleby, 2006), über sie erfolgt die Assoziation der Dimeren zu Tetrameren. ThDP-abhängige Enzyme kommen auch in Multienzymkomplexen, wie dem Pyruvatdehydrogenase-Komplex (Frank *et al.*, 2005) vor. Entweder sind die aktiven Formen der Enzyme Dimere wie bei der verzweigtkettigen 2-Ketosäuredecarboxylase (Berthold *et al.*, 2007), oder sie liegen als Tetramer vor (Pohl *et al.*, 2009). Ein Tetramer lässt sich am besten als Dimer aus Dimeren beschreiben (Duggleby, 2006). Zu den Tetrameren der ThDP-abhängigen Enzymen der DC-Familie gehören die meisten 2-Ketosäuredecarboxylasen

(Arjunan *et al.*, 1996, Dobritzsch *et al.*, 1998, Dyda *et al.*, 1993, Gocke, 2007, Hasson *et al.*, 1998, Schütz *et al.*, 2003, Versées *et al.*, 2007) sowie die Benzaldehydlyase (Maraite *et al.*, 2007, Mosbacher *et al.*, 2005). Neben der Bildung von Tetrameren haben manche Pyruvatdecarboxylasen (PDC) die Tendenz zu Dimeren zu dissoziieren (Kutter *et al.*, 2006) oder höher molekulare Zustände, wie Octamere, anzunehmen (Pohl *et al.*, 1994, Raj *et al.*, 2002). So wurden molekulare Massen von bis zu 300–500 kDa für pflanzliche PDCs beobachtet (König, 1998).

1.4.4 Spezielle Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme

Im folgenden Kapitel, werden die für diese Arbeit relevanten Enzyme vorgestellt. Dabei handelt es sich um die Benzoylformiatdecarboxylase (BFD) aus *Pseudomonas putida*, bzw. eine Variante, die BFDH281A mit erhöhter Carboligaseaktivität und die Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens*.

1.4.4.1 Benzoylformiatdecarboxylase (BFD) aus *Pseudomonas putida*

Die BFD aus *P. putida* ATCC 12633 (EC 4.1.1.7) wurde erstmals 1966 von Hegemann und Mitarbeitern beschrieben (Hegeman, 1970). Sie ist Teil des Mandelat-Abbauewegs von *P. putida* und katalysiert dort die Decarboxylierung von Benzoylformiat zu Benzaldehyd (Tsou *et al.*, 1990). Das aus dem Benzaldehyd gebildete Benzoat wird im β -Ketoadipat-Weg zu Succinyl-CoA und Acetyl-CoA umgewandelt und im Citrat-Zyklus metabolisiert (Stanier und Ornston, 1973). Die BFD ermöglicht so das Wachstum von *P. putida* auf Benzoylformiat als Kohlenstoffquelle. 1990 wurde das kodierende Gen *mdlC* zum ersten Mal kloniert (Tsou *et al.*, 1990). Bisher wurden sechs weitere BFDs mit Benzoylformiat-spaltender Aktivität nachgewiesen (Henning *et al.*, 2006, Saehuan *et al.*, 2007, Wendorff, 2006). Zwei davon, die BFD β und die BFD γ , stammen ebenfalls aus *P. putida* ATCC12633 (Henning *et al.* 2006). Die bis heute am besten charakterisierte BFD, stellt aber die zuerst identifizierte BFD dar (Iding *et al.*, 2000, Siegert *et al.*, 2005).

Ihr Substratspektrum für die Decarboxylasereaktion und kinetische Parameter wurden ausführlich untersucht. Gegenüber Benzoylformiat besitzt sie, verglichen mit anderen bekannten BFDs, die höchste spezifische Aktivität (V_{\max} : 400 U/mg, K_M : 0,37 mM) (Gocke *et al.*, 2008). Sterisch anspruchsvollere aromatische sowie aliphatische 2-Ketosäuren werden allerdings nur in geringem Maße akzeptiert (Iding *et al.*, 2000).

Im Allgemeinen ist die BFD in der Lage, Acetaldehyd mit verschiedenen aromatischen, heteroaromatischen, zyklisch aliphatischen und olefinischen Aldehyden zu verknüpfen (Dünnwald *et al.*, 2000, Iding *et al.*, 2000). Aufgrund der hohen Chemo Selektivität für aromatische Donoraldehyde entsteht bei diesen Carboligasereaktionen vorrangig das 2-HPP-Produkt (Dünnwald *et al.*, 2002). Dies spiegelt sich in den kinetischen Parametern für die Synthese von (*S*)-2-HPP (V_{\max} : 7 U/mg, 92% *ee*), (*R*)-Benzoin (V_{\max} : 0,25 U/mg, 99% *ee*) und (*R*)-Acetoin (V_{\max} : < 0,01 U/mg, 35% *ee*) wider (Müller *et al.*, 2009). Parameter wie Selektivität, Aktivität und Stabilität der BFD konnten mittels Optimierung der Reaktionsbedingungen verbessert werden. Des Weiteren konnte der Einfluss der Temperatur und der Benzaldehydkonzentration auf den Enantiomerenüberschuss von (*S*)-2-HPP gezeigt werden (Iding *et al.*, 2000).

Generell ist die Carboligaseaktivität gegenüber der Lyaseaktivität nur sehr gering (ca. 1 %). Über den Austausch des Histidins an Position 281 gegen ein Alanin, konnte eine BFD Variante mit einem vergrößerten aktiven Zentrum im Bereich der Akzeptorbindestelle erhalten werden (Polovnikova *et al.*, 2003, Siegert *et al.*, 2005). Diese zeigt zwar eine verminderte Decarboxylaseaktivität von nur 35 U/mg, dafür ist die Ligaseaktivität für die Benzoinkondensation mit Benzaldehyd als Substrat (50 U/mg) um mehr als das 100-Fache gesteigert (Knoll *et al.*, 2006, Siegert *et al.*, 2005). So dient die BFDH281A neben der BAL als nützlicher Katalysator für die asymmetrische Benzoinkondensation (Carboligation unterschiedlich substituierter Benzaldehyde), wobei auch *ortho*-substituierte Benzaldehyde als Akzeptoren eingesetzt werden können (Dünnwald *et al.*, 2002). Aufgrund dem vergrößerten aktiven Zentrum und der damit einhergehenden verbesserten Benzoinkondensation, wird die BFDH281A der BAL ähnlicher (Knoll *et al.*, 2006) und wird deshalb in dieser Arbeit für vergleichende Analysen verwendet.

1.4.4.2 Benzaldehydlyase (BAL) aus *Pseudomonas fluorescens*

Die Benzaldehydlyase (BAL, EC 4.1.2.38) konnte über die Fähigkeit des aus den Holzresten aus einer Cellulosefabrik isolierten Stammes *Pseudomonas fluorescens* Biovar I mit Benzoin als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen, identifiziert werden. Dies ist durch die von der BAL katalysierten Spaltung von Benzoin zu Benzaldehyd möglich (González *et al.*, 1986, González und Vicuña, 1989), welches vermutlich im β -Ketoacid-Weg metabolisiert wird. Zunächst wurde vermutet, dass die Spaltung von 2-Hydroxyketonen irreversibel ist, Demir und Mitarbeiter konnten aber die Bildung von C-C-Bindungen im Sinne der Benzoin-

kondensation, mit exzellenten Enantiomerenüberschüssen (Benzoin und 2-HPP mit $ee > 99\%$), nachweisen (Demir *et al.*, 2001, Demir *et al.*, 2002). Die Selbstligation von Benzaldehyd zu Benzoin erfolgt sogar mit einer hohen katalytischen Aktivität (V_{\max} : 320 U/mg, K_M : 10 mM), welche gegenüber der reversen Reaktion um mehr das Dreifache höher ist (V_{\max} : 74 U/mg, K_M : 0,05 mM). Die Spaltung von (*R*)-2-HPP ist sogar noch langsamer (V_{\max} : 3,6 U/mg, K_M : 0,3 mM) (Janzen *et al.*, 2006).

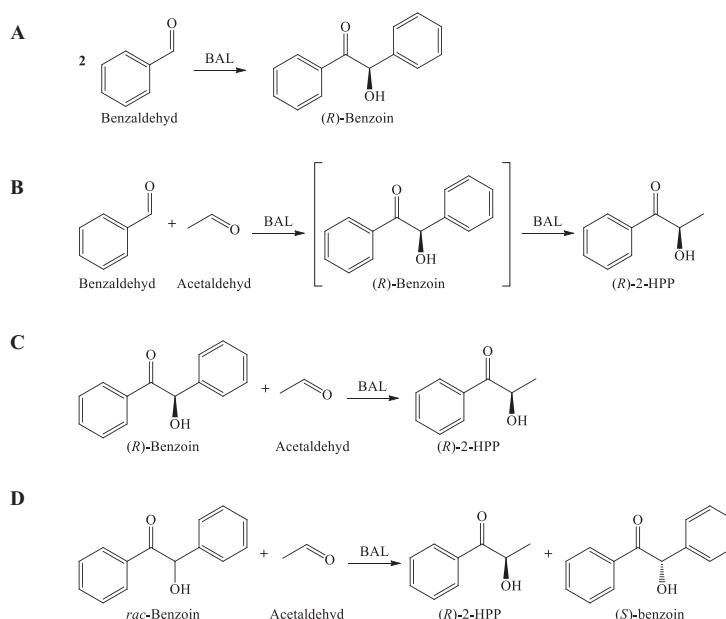


Abb. 12: Verschiedene durch die BAL katalysierte Reaktionen (Demir *et al.*, 2001). **A:** Carboligation von Benzaldehyd zu (*R*)-Benzoin. **B:** Carboligation von Benzaldehyd und Acetaldehyd zu (*R*)-2-HPP, wobei zuerst (*R*)-Benzoin aus der Selbstligation von Benzaldehyd als Zwischenprodukt entsteht, anschließend aber wieder gespalten und mit Acetaldehyd zu (*R*)-2-HPP verknüpft wird. **C:** (*R*)-Benzoin wird in der Lyasereaktion zu Benzaldehyd welches anschließend mit Acetaldehyd zu (*R*)-2-HPP verknüpft wird. **D:** Racematspaltung von Benzoin mit Acetaldehyd als Co-Substrat, das (*R*)-Benzoin wird in der Lyasereaktion gespalten und in der Ligasereaktion der entstandene Benzaldehyd mit Acetaldehyd zu (*R*)-2-HPP verknüpft. Aufgrund der strikten (*R*)-Spezifität der BAL bleibt das (*S*)-Benzoin unangetastet zurück.

Die BAL aus *Pseudomonas fluorescens* ist aufgrund ihrer Fähigkeit zur 2-Hydroxyketon-spaltung bisher einzigartig unter den ThDP-abhängigen Enzymen (Müller *et al.*, 2009). Bisher konnte für keine potentielle BAL, welche Aufgrund von Sequenzvergleichen als BAL eingestuft wurde, die Spaltung von 2-Hydroxyketonen nachgewiesen werden (Brosi, 2006, Gocke *et al.*, 2007, Kolter, 2009). Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Spaltung von 2-Hydroxyketonen und der strikten *R*-Spezifität, kann die BAL zur Racematspaltung von racemischen Benzoin eingesetzt werden, um so das sonst nur schwer zugängliche (*S*)-Benzoin zu erhalten.

Das (*R*)-Benzoin wird zu Benzaldehyd gespalten und in Gegenwart von Acetaldehyd wird (*R*)-2-HPP gebildet, das (*S*)-Benzoin (*ee* > 99%) bleibt unverändert zurück (Demir *et al.*, 2001). Nach dem gleichen Prinzip kann auch eine Racematspaltung verschiedener aromatischer, heteroaromatischer und asymmetrischer 2-Hydroxyketone erfolgen (Demir *et al.*, 2001, Dünkermann *et al.*, 2002, Dünkermann *et al.*, 2004).

Die BAL stellt eines der vorteilhaftesten Enzyme aus der Reihe der ThDP-abhängigen Enzyme dar (Müller *et al.*, 2009). Neben ihrer Fähigkeit zur Spaltung von 2-Hydroxyketonen, ihrer hohen katalytischen Aktivität, guten Umsätzen und exzellenten Stereoselektivität für die Synthese von aromatischen und heteroaromatischen 2-Hydroxyketonen, besitzt die BAL ein sehr breites Substratspektrum. Sie akzeptiert eine Reihe von *ortho*-, *meta*- und *para*-substituierten Benzaldehyden sowie längerkettige aliphatische Aldehyde und olefinische Aldehyde als Substrate (Demir *et al.*, 2001, Demir *et al.*, 2002).

1.4.4.3 BAL und BFD: Struktur, Aktivität und Stabilität im Vergleich

Die Kristallstruktur der BAL wurde 2005 mit 2,6 Å Auflösung publiziert (Mosbacher *et al.*, 2005) und 2007 auf 1,65 Å verfeinert (Maraite *et al.*, 2007). 2008 folgte die Auflösung der Struktur mit dem Inhibitor Methylbenzoylphosphonat (2,49 Å) (Brandt *et al.*, 2008). Die Kristallstruktur der BFD wurde erstmalig von Hasson und Mitarbeitern mit 1,6 Å aufgelöst (Hasson *et al.*, 1995, Hasson *et al.*, 1998). Später folgten BFD-Kristallstrukturen mit Inhibitoren wie (*R*)-Mandelat (2,8 Å) (Polovnikova *et al.*, 2003) und Methylbenzoylphosphonat (1,37 Å) (Brandt *et al.*, 2009). Obwohl die Sequenzähnlichkeit der BAL und der BFD mit etwa 24% nur sehr gering ist, zeigen sie strukturell kaum Unterschiede (Abb. 13) (Knoll *et al.*, 2006, Mosbacher *et al.*, 2005).

Ein Monomer der BFD besteht aus 528 Aminosäuren (AS) mit einem Molekulargewicht von 56,2 kDa (Hachisu *et al.*, 2003, Hasson *et al.*, 1998), ein Monomer der BAL aus 563 AS mit einem Molekulargewicht von 59,8 kDa (Janzen *et al.*, 2006), wobei die röntgenkristallographische Auflösung der BAL, aufgrund der ungeordneten C-terminalen Struktur, nur bis AS 555 möglich war (Mosbacher *et al.*, 2005). Beide Enzyme liegen als Homotetramere vor (Kapitel 1.4.3) (Hasson *et al.*, 1998, Mosbacher *et al.*, 2005). Ein Histidinrest (His29 bei der BAL und His70 bei der BFD) im aktiven Zentrum, fungiert als Protonenakzeptor bzw. Donor bei der Katalyse (Knoll *et al.*, 2006).

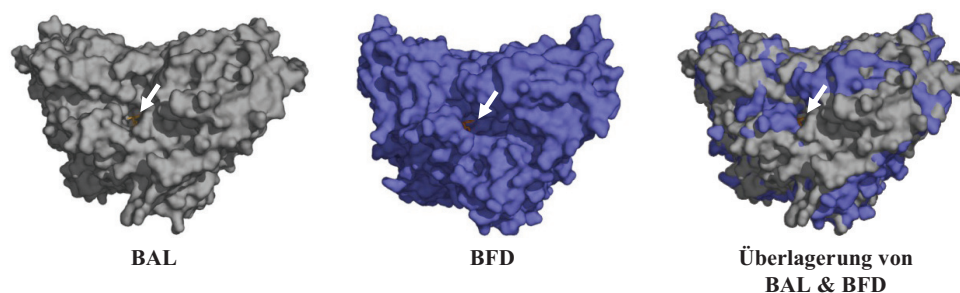


Abb. 13: Oberflächendarstellung von jeweils einem Dimer der BAL und der BFD sowie die Überlagerung beider Strukturen. Ein aktives Zentrum (Pfeil) mit gebunden ThDP (orange) ist jeweils frontal abgebildet. Die Abbildungen wurden von Dr. Michael Knoll (Universität Stuttgart) mit dem Programm PyMol erstellt.

Der größte strukturelle Unterschied ist wohl in den aktiven Zentren der beiden Enzyme zu finden. Im Vergleich zur BFD ist das aktive Zentrum der BAL relativ ausgedehnt, dies ist hauptsächlich begründet in der Rückgratorientierung an den Histidinresten His281 (BFD) und His286 (BAL). Aufgrund der längeren Schleife und der unterschiedlichen Rückgratorientierung reicht His281 tiefer in die Binde Tasche der BFD hinein als His286 bei der BAL (Knoll *et al.*, 2006). Des Weiteren besitzt die BFD eine so genannte *S*-Tasche, welche den Zugang zu (S)-2-HPP ermöglicht (Kapitel 1.4.4.1), die Rückgratorientierung der BAL erlaubt eine solche Struktur nicht (Knoll *et al.*, 2006). Ein weiterer auffälliger Unterschied liegt im Zugang des aktiven Zentrums. Während die BAL wie die meisten ThDP-abhängigen Enzyme eine C-terminale α -Helix besitzt welche den Substratkanal verengt, fehlt diese bei der BFD völlig. Dies führt zu einer Verschiebung und Erweiterung des Zugangs zum aktiven Zentrum der BFD (vgl. Abb. 13) (Knoll *et al.*, 2006). Aufgrund dieses erweiterten Substratkanals, wurde in der BFD eine erleichterte Freisetzung der sterisch anspruchsvollen Carboligationsprodukte vermutet (Kokova *et al.*, 2009, Zavrel *et al.*, 2008).

Wie bereits in Kapitel 1.4.4.1 und 1.4.4.2 besprochen ist die Ligaseaktivität der BAL um ein Vielfaches höher als die der BFD. Die wesentlich höhere Aktivität der BAL z.B. bei der Ligation von Benzaldehyd zu Benzoin (V_{\max} BAL: 320 U/mg, V_{\max} BFD: 0,25 U/mg) wird zum größten Teil in der unterschiedlichen Größe der Substrat-Bindetaschen begründet (Knoll *et al.*, 2006). Hieraus resultiert auch das wesentlich breitere Substratspektrum der BAL, vor allem für sterisch anspruchsvolle Substrate. Die Vergrößerung des aktiven Zentrums durch den Austausch des His281 zu der kleineren Aminosäure Alanin führte in der BFD zu einer erhöhten Carboligaseaktivität und einer Erweiterung des Substratspektrums, welche aber immer noch nicht an die BAL heranreichen können (Kapitel 1.4.4.1) (Knoll *et al.*, 2006). Die

BAL besitzt als einziges ThDP-abhängiges Enzym die Fähigkeit zur Spaltung von 2-Hydroxyketonen, weist aber entgegengesetzt zur BFD keine nachweisbare Decarboxylaseaktivität auf (Janzen *et al.*, 2006, Knoll *et al.*, 2006).

Die Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit vom pH-Wert weisen eine erhöhte Ligaseaktivität der BAL in leicht alkalischen Reaktionsmedien nach (mit Optima zwischen pH 8 und 9,8) (Domínguez de María *et al.*, 2006, Janzen *et al.*, 2006, Kokova, 2009, Schmidt *et al.*, 2009, Stillger *et al.*, 2006). Das Optimum, ebenfalls bezogen auf die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten, für die Lyaseaktivität beträgt pH 8 (Janzen *et al.*, 2006). Bei pH-Werten oberhalb von pH 8 nimmt die Stabilität der BAL rapide ab, ihr pH-Optimum bezogen auf die Stabilität liegt etwa bei pH 7 (Janzen *et al.*, 2006, Stillger *et al.*, 2006), so dass die meisten Reaktionen bei pH-Werten zwischen 7,5 und 8 durchgeführt werden. Für die BFD liegen die pH-Optima (Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten) bei etwa pH 6-6,5 für die Decarboxylierung und bei etwa pH 7 für die Carboligation (Iding *et al.*, 2000). Das Optimum der BFDH281A Variante ist vergleichbar mit dem Wildtyp (Kokova, 2009).

Insgesamt weist die BFD eine höhere Stabilität auf als die BAL. Direkte Vergleiche aus der Literatur sind relativ schwierig, da Pufferzusammensetzungen, pH-Werte, Temperaturen, Testbedingungen sowie die Kosolventienkonzentrationen variieren. Zudem können Stabilitäten von verschiedenen Enzymchargen variieren. Doch auch bei kritischer Betrachtung ist der Unterschied als eindeutig festzuhalten. Verhältnismäßig gut miteinander vergleichbare Literaturdaten zeigen für die BFD in rein wässrigen Puffern Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) zwischen 36 ± 7 (Iding *et al.*, 2000) und 55 ± 19 (Mikolajek *et al.*, 2009) Tagen bei 30 °C bzw. 20 °C, während für die BAL Halbwertszeiten von etwa 10 bis 82 Stunden, in rein wässrigen Puffern bei 20-30 °C beschrieben sind (Domínguez de María *et al.*, 2006, Kokova, 2009, Mikolajek *et al.*, 2009, Stillger, 2004, van den Wittenboer, 2009). Durch den Einsatz von Kosolventien, vor allem DMSO, kann die Stabilität der BAL erhöht werden, die Angaben variieren aber auch hier sehr stark. Bei Temperaturen von 20-30 °C sind Stabilisierungen um den Faktor 4 beschrieben (Kokova, 2009). Damit ist die Stabilität aber immer noch um ein Vielfaches geringer als die der BFD. Temperaturen oberhalb von 40 °C sind vor allem für die BAL ungeeignet ($t_{1/2}$: zwischen $0,4 \pm 0,1$ h und $1,3 \pm 0,4$ h), aber auch die BFD sowie die Variante BFDH281A zeigen mit Halbwertszeiten zwischen 50 und 60 Stunden bei 40 °C eine geringere Stabilität (Kokova, 2009, Mikolajek *et al.*, 2009).

Interessanterweise sind beide Enzyme unter Prozessbedingungen mit Aldehyden als Substrate weit weniger stabil. Für die BFD wurde bei Anwesenheit von Acetaldehyd (100 und 200 mM) eine Verringerung der ermittelten Halbwertszeit von ca. 36 Tagen auf 1,5 – 1,8 Tage bzw. mit Benzaldehyd (25 mM) auf 5,3 Tage beobachtet (Iding *et al.*, 2000). Mit Propanal (100 mM) als Substrat fiel die Halbwertszeit von etwa 55 Tagen auf 3,9 Tage ab (Mikolajek *et al.*, 2009). Noch gravierender, hinsichtlich der Anwendung in Syntheseprozessen, stellt sich die Inaktivierung der BAL in Anwesenheit der aldehydischen Substrate dar. Bei Inkubation mit aliphatischen Aldehyden wurden Halbwertszeiten der BAL von 3,7 Stunden (100 mM Methoxyacetaldehyd) und 4 Stunden (100 mM Propanal) ermittelt (Hildebrand *et al.*, 2007, Mikolajek *et al.*, 2009). Bei Verwendung aromatischer Substrate wie 3-Methoxy- und 2-Chlorbenzaldehyd konnte bereits nach wenigen Minuten (15-30 min) eine hohe bzw. vollständige Inaktivierung beobachtet werden (Zehentgruber, 2006). Als Ursache für die hohe Inaktivierungsrate wurde die kovalente Bindung der Aldehyde an die freie Aminogruppe von Lysinresten unter Ausbildung einer Schiff-Base vermutet. Die schnelle Inaktivierung ist für länger währende Synthesen nicht besonders vorteilhaft. Bisher ist die Inaktivierung der BAL durch die Aldehyde kaum untersucht und ist ein wichtiger Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.5 Aktivität und Stabilität der BAL in unkonventionellen Medien

1.5.1 Verwendung von Kosolventien

Aufgrund der geringen Löslichkeit der aromatischen Substrate und Produkte wurde der Einsatz von Kosolventien, besonders von Dimethylsulfoxid (DMSO) eingehend untersucht. Demir und Mitarbeiter beschrieben den Einsatz von 20 vol% DMSO (v/v) als förderlich für die Synthese von chiralen 2-Hydroxyketonen mit der BAL (Demir *et al.*, 2001, Demir *et al.*, 2002). Für die BAL konnte bei Einsatz von 20 vol% DMSO eine Senkung der Lyaseaktivität um 85-88% (Benzoinspaltung) dafür aber eine Steigerung der Ligaseaktivität (30 mM Benzaldehyd) von etwa 20% beobachtet werden (Janzen, 2002, Janzen *et al.*, 2006), wobei die verbesserte Ligaseaktivität auch auf eine pH-Verschiebung im Puffer durch die Zugabe von DMSO zurückzuführen sein kann (Kokova, 2009). Durch die Zugabe von 20 vol% DMSO zu dem meist verwendeten Kaliumphosphatpuffer (Kpi), verschiebt sich der pH-Wert des Puffers um 0,5 Einheiten ins Alkalische, bei 30 vol% DMSO sind es sogar 0,7 pH Einheiten (Kokova, 2009, Stillger, 2004). Der Versuch von Janzen wurde ausgehend von Kpi-Puffer mit einem pH von 7 durchgeführt (Janzen, 2002). Unter Berücksichtigung, dass BAL

höhere Reaktionsraten bei schwach alkalischen pH-Werten aufweist (Kapitel 1.4.4.3), kann eine pH-Verschiebung auf pH 7,5 die erhöhte Carboligationsrate erklären. Versuche mit DMSO Konzentrationen von 0-50 vol% in Kpi-Puffer, bei denen der pH-Wert nach Zugabe von DMSO auf pH 8 eingestellt wurde, zeigten, dass die Anfangsreaktionsrate für die Carboligation von Benzaldehyd bei steigender DMSO-Konzentration im Puffer abnimmt (Kokova, 2009). Leicht abweichende Ergebnisse ergeben sich für die Ligation von 3,5-Dimethoxybenzaldehyd bei verschiedenen DMSO-Konzentrationen (Schmidt *et al.*, 2009). Vergleicht man die relativen Aktivitäten bei pH 8 (justiert nach Zugabe des DMSO) unter Verwendung von DMSO-Konzentrationen von 5-25 vol%, ist der Unterschied in der Aktivität relativ gering. Erst bei DMSO-Konzentration über 25 vol% fällt die Aktivität bei pH 8 entscheidend ab (Abb. 14).

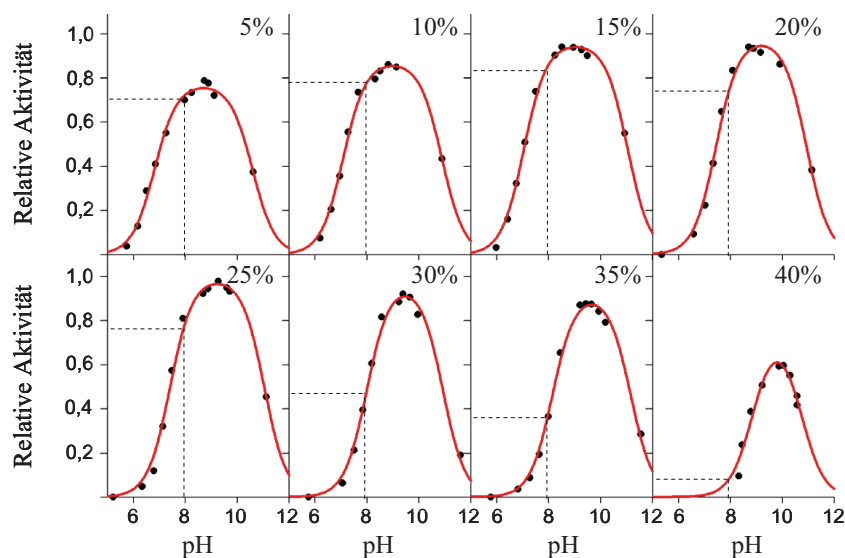


Abb. 14: pH-Profil für die Anfangsaktivität der BAL bei verschiedenen DMSO-Konzentrationen (nach Schmidt *et al.* 2009). Gemessen wurde Umsatz von 5 mM 3,5-Dimethoxybenzaldehyd zu 3,3',5,5'-Tetramethoxybenzoin mittel UV/Vis-Spektroskopie innerhalb von 2 min. 100 mM Kpi-Puffer, 0,25 mM $MgCl_2$, 0,25 mM ThDP, $T=25\text{ }^{\circ}C$.

Interessanterweise wurde eine Verschiebung des pH-Optimums bei Erhöhung der DMSO-Konzentration beobachtet (pH 8,7-9,8) (Schmidt *et al.*, 2009). Ein ähnlicher Effekt konnte auch für die BFDH281A bei der Carboligation von Benzaldehyd gefunden werden (Kokova, 2009). Im Katalysezyklus der BAL, sowie der BFD finden einige Protonenübertragungen statt (Kapitel 1.4.2), eine Interaktion von DMSO mit den Intermediaten oder Aminosäureseitenketten könnte zu den beobachteten Effekten führen. So wird z.B. ein durch DMSO

veränderter pK_S -Wert für den hochkonservierten Glutaminrest, welcher als Protonenakzeptor im Katalysezyklus dient, für die veränderten pH-Aktivitäten als eine mögliche Ursache vermutet (Schmidt *et al.*, 2009).

Die höchste Aktivität der BAL konnte bei einer DMSO-Konzentration von 25% und einem pH von 9,2 ermittelt werden (Schmidt *et al.*, 2009). Bei der Betrachtung solcher Daten, sollte aber stets beachtet werden, dass der pH-Wert eigentlich nur für rein wässrige Lösungen definiert ist. Durch Zugabe von Kosolventien können z.B. Dissoziationskonstanten von Säuren sowie Abschirmungsverhalten der Lösung von Protonen verändert sein. Fehlerraten bei der Messung der pH-Werte sind zusätzlich durch einen langsameren Protonenfluss erhöht. So können pH-Messungen zur besseren Vergleichbarkeit in wässrig-organischen Systemen nützlich sein, können aber nicht uneingeschränkt mit pH-Werten in rein wässrigen Systemen gleichgesetzt werden (Frant, 1995). Auch könnten verschiedene Methoden zur Bestimmung des pH-Wertes, wie z.B. die Kalibrierung der pH-Elektrode mit oder ohne DMSO im Kalibrierpuffer oder die Wahl der Elektrode zu unterschiedlichen Messwerten führen. In diesem Fall jedoch bieten die Messungen von Schmidt (Schmidt *et al.*, 2009) eine mögliche Erklärung für die verschiedenen publizierten pH-Optima für die Carboligation von Benzaldehyd im Bereich von pH 8-9,5 (Kapitel 1.4.4.3).

Beim Vergleich der kinetischen Messungen zur Bestimmung von V_{\max} und K_M kann für die Carboligation von Benzaldehyd durch die BAL mit DMSO ein längerer linearer Anstieg der Reaktionsrate in Abhängigkeit von der Substratkonzentration verzeichnet werden als in Puffer. D. h. in reinem Puffer wird bereits bei geringen Substratkonzentrationen (ca. 30 mM Benzaldehyd) eine Sättigung der Reaktion erreicht (Janzen, 2002, Kokova *et al.*, 2009, Kühl, 2009). Bei Zugabe von 10 bzw. 30 vol% DMSO ist bei 60 mM Benzaldehyd noch keine Sättigung zu verzeichnen (Kokova *et al.*, 2009, Kühl, 2009). So wird durch den Einsatz von DMSO sowie dem Einsatz größerer Substratkonzentrationen die maximale Reaktionsrate um etwa das 2-4 Fache erhöht (k_{cat} : 35 s^{-1} in Puffer und 78 s^{-1} mit 10 vol% DMSO) (Kokova *et al.*, 2009); (V_{\max} : 161 U/mg in Puffer und 447 U/mg mit 30 vol% DMSO) (Kühl, 2009). Allerdings ist zu Bedenken, dass bei diesen Untersuchungen die pH-Verschiebung nach Zugabe von DMSO nicht berücksichtigt wurde. Mittels NMR-Analysen konnte aber bestätigt werden, dass die Produktfreisetzung mit DMSO gegenüber Puffer ohne Kosolvents begünstigt ist und es sich bei der erhöhten Reaktionsrate um einen echten kinetischen Effekt durch die Zugabe von DMSO handelt (Kokova *et al.*, 2009).

Mit DMSO konnte eine Verringerung der Bindungskonstanten, welche sich in einem höheren K_M -Wert widerspiegelt, gefunden werden (Kokova *et al.*, 2009, Kühl, 2009). Durch alleinige Variation des Puffer pHs konnte kein Einfluss auf den K_M der BAL identifiziert werden (Schmidt, 2008). Leider sind die Reaktionsraten in Abhängigkeit von der Substratkonzentration nicht verfügbar. Für andere bisher untersuchte organische Lösungsmittel als Kosolventien, wie Aceton (10% v/v) und *tert*-Butylmethylether (MTBE) (5% v/v) ist der Einfluss auf die kinetischen Parameter V_{\max} und K_M im Vergleich zu DMSO nur gering (Kokova *et al.*, 2009, Kühl, 2009). Für DMF konnte bis 15 vol% eine Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit, aber keine signifikante Änderung des K_M -Werts ermittelt werden (Schmidt, 2008).

Der Einfluss auf die Stabilität der BAL wurde für eine Reihe organischer Lösungsmittel untersucht (Domínguez de María *et al.*, 2006, Kokova, 2009, Kühl, 2009, Schmidt, 2008, Stillger, 2004, van den Wittenboer, 2009). Teilweise sind auch hier die Ergebnisse recht widersprüchlich: z. B. wies Stillger eine Stabilisierung der BAL um das 75-fache in MTBE gesättigtem Puffer (5% v/v MTBE) gegenüber der Lagerung in Puffer nach. Van den Wittenboer beobachtete aber eine Verringerung der Halbwertszeit um den Faktor 5. Möglicherweise sind diese Unterschiede durch abweichende Bedingungen begründet, wie verwendete Puffer, Kofaktor- oder Enzymkonzentrationen, Temperaturen oder Enzymcharge. Auch bei der Analyse der Stabilität der BAL in Puffern mit DMSO als Kosolvents sind recht große Unterschiede in der Stabilisierung der BAL beschrieben. Während Stillger mit 30 vol% DMSO und Lagerung bei 4 °C eindeutig die höchste Stabilisierung aller untersuchten Lösungsmittel um das 150-fache beobachtete, konnte Kokova bei 4°C keine Stabilisierung nachweisen. Allerdings wirkte sich hier die Zugabe von 30 vol% DMSO positiv auf die Temperaturstabilität der BAL aus, bei 30 °C und 40 °C wurde eine Erhöhung der Halbwertszeit auf etwa das 3-fache erzielt (Kokova, 2009, Stillger, 2004).

Insgesamt kann die Verwendung von Kosolventien, besonders DMSO als positiv für BAL-katalysierte Reaktionen angesehen werden. Sie bieten die Möglichkeit, höhere Substratkonzentrationen einzusetzen und können, je nach Wahl der Bedingungen, einen positiven Einfluss auf die Stabilität und/oder die Gesamtaktivität der BAL nehmen.

In den meisten Arbeiten wird die Carboligation von unsubstituiertem Benzaldehyd zu Benzoin für kinetische Messungen herangezogen. Die abweichenden Ergebnisse von Kokova

und Schmidt für die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten der BAL mit festen Ausgangskonzentrationen von Benzaldehyd und 3,5-Dimethoxybenzaldehyd bei pH 8 (Kokova, 2009, Schmidt *et al.*, 2009) zeigen, dass Ergebnisse welche mit unterschiedlichen Substraten ermittelt wurden nicht unbedingt übertragbar sind. Auch dieser Aspekt ist ein wichtiger Gegenstand dieser Arbeit.

1.5.2 BAL in wässrig-organischen Zweiphasensystemen

Einige Studien haben sich vor allem in den letzten Jahren mit der Anwendung der BAL in wässrig-organischen Zweiphasensystemen beschäftigt, ein Großteil dieser Arbeiten verlief parallel zu der vorliegenden Arbeit (Kühl, 2009, Schmidt, 2008, Stillger, 2004, van den Wittenboer, 2009, Zavrel, 2009, Zehentgruber, 2006). Wobei die Schwerpunkte recht unterschiedlich gelagert waren. Stillger, Kühl und Zehentgruber stellten generelle Reaktorkonzepte für die Synthese von aromatischen und heteroaromatischen 2-Hydroxyketonen auf. Die Arbeiten von Schmidt und Zavrel dienten hauptsächlich der Erstellung von mathematischen Modellen, welche bei der Prozessoptimierung und Bestimmung kinetischer Parameter helfen sollen. Während van den Wittenboer's Studien sich auf die Stabilisierung der BAL gegenüber molekularer- und Grenzflächentoxizität der organischen Lösungsmittel konzentrierte.

Bei der Betrachtung der Studien wird deutlich, dass Zweiphasensysteme äußerst komplexe Reaktionssysteme darstellen, bei denen eine Vielzahl von Faktoren zusammenspielen. Alle Studien im Detail miteinander zu vergleichen, würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Zusätzlich sind die Bedingungen, verwendeten Lösungsmittel sowie die betrachteten Parameter zum Teil sehr unterschiedlich gewählt, so dass hier nur einige generelle Trends und Aspekte besprochen werden.

Generell scheinen sich im homogenen System bestimmte kinetische Parameter, sehr gut auf die verwendeten Zweiphasensysteme übertragen zu lassen (Kühl, 2009, Schmidt, 2008, Stillger, 2004). Vor allem mit emulgierten Phasen konnten recht gute Ausbeuten erzielt werden (Kühl, 2009, Schmidt, 2008, Stillger, 2004, Zehentgruber, 2006). Für die Synthese von Benzoin und Benzoin-Derivaten stellte sich ein Reaktionssystem mit den aromatischen Substraten selbst als organische Phase gegenüber MTBE als vorteilhaft heraus (Kühl, 2009, Zehentgruber, 2006). Ein Nachteil bei der Verwendung von MTBE als organische Phase, stellt der geringe Anteil von Substrat in der wässrigen, also der reaktiven Phase dar.

Hierdurch werden die Reaktionsraten der BAL limitiert (Kühl, 2009, Stillger, 2004, Zavrel, 2009). Begründet auf einem mathematischen Modell zur Berechnung der Verteilungskoeffizienten von Substraten und Produkten (Eckstein *et al.*, 2006, Spiess *et al.*, 2008), konnte Methylisobutylketon (MIBK) zumindest für 3,5-Dimethoxybenzaldehyd als Substrat als vorteilhafteres Lösungsmittel identifiziert werden. Das Substrat besitzt im Verhältnis zum Produkt 3,3',5,5'-Tetramethoxybenzoin (TMBZ) einen relativ kleinen Verteilungskoeffizienten, d.h. ein größerer Anteil des Substrates liegt in der wässrigen Phase vor - während der Anteil des gelösten Produktes im Verhältnis relativ gering ist (Zavrel, 2009). Eine molekulare Toxizität gegenüber der BAL konnte nicht nachgewiesen werden, bei sehr kleinen Interphasenflächen wurde auch keine Grenzflächentoxizität beobachtet (Schmidt, 2008).

Stofftransferlimitierungen mit organischen Lösungsmitteln als zweiter Phase, konnten durch Vergrößerung der Phasengrenze verringert werden (Schmidt, 2008, Zavrel, 2009). Eine Vergrößerung der Phasengrenze, wurde z.B. durch die Verwendung eines Reaktors mit großem Durchmesser und geringer Höhe erreicht, wenn die Phasen getrennt voneinander gehalten werden sollten (Schmidt, 2008). Alternativ wurden die Phasen durch gründliches Vermischen emulgiert (Schmidt, 2008, Zavrel, 2009). Durch Modellanpassungen konnte Schmidt zeigen, dass die Effektivität der BAL, verifiziert an Raum-Zeit-Ausbeuten (Produktausbeute pro Zeiteinheit und Reaktorvolumen) abhängig von einer Vielzahl von Faktoren ist. Neben der Temperatur und pH sind die Reaktionszeit, die Enzym- und Kosolventkonzentration entscheidend. Die optimalen Bedingungen für die genannten Parameter weisen im Ein- und Zweiphasensystem nochmals extreme Unterschiede auf. Ausschlaggebend für die ermittelten Raum-Zeit-Ausbeuten ist ein Kompromiss zwischen der Aktivität und der Stabilität der BAL unter den entsprechenden Bedingungen, im Zweiphasensystem spielen zusätzlich Änderung in der Geschwindigkeit des Stofftransportes zwischen den Phasen eine Rolle. Anhand der erstellten Modelle konnte unter optimierten Bedingungen auch experimentell im Zweiphasensystem, vor allem durch Emulgierung der Phasen, hohe Raum-Zeit-Ausbeuten erreicht werden (Schmidt, 2008).

Je nach Lösungsmittel und analysierten Bedingungen, liegen unterschiedliche Stabilitäten der BAL gegenüber der Grenzfläche vor (Kühl, 2009, Schmidt, 2008, Stillger, 2004, van den Wittenboer, 2009, Zavrel, 2009). Festgehalten werden kann aber, dass die BAL einer Grenzflächentoxizität unterliegt und diese bei Vergrößerung der Phasengrenze auch verstärkt wird.

Ein besonderer Effekt, welcher sich in allen Studien widerspiegelt und auch schon für homogene Reaktionssysteme beschrieben wurde, ist die schnelle Inaktivierung der BAL unter Reaktionsbedingungen. Bei Zugabe der Reaktanden, sprich der Substrate, ist in jedem Fall eine um ein Vielfaches erhöhte Inaktivierung zu verzeichnen. Dabei scheinen andere Enzymstabilisierende sowie inaktivierende Faktoren entweder völlig in den Hintergrund zu treten oder nur einen verhältnismäßig geringen Anteil zu haben. Beim Vergleich der Enzymstabilität unter Reaktionsbedingungen konnten Zehentgruber und Kühl keinen Unterschied in der Enzymstabilität mit DMSO und MTBE als Kosolventien gegenüber der Synthese mit Substrat als organische Phase feststellen. Die Aktivität sank in allen Fällen etwa auf 25-35% innerhalb von 30 min. Eine Stabilisierung der BAL durch die Kosolventien oder eine zusätzliche Inaktivierung der BAL an der Grenzfläche scheint hier keine Rolle zu spielen. Mit MTBE als organische Phase war die Inaktivierung noch höher, hier betrug die Aktivität nach 30 min noch etwa 5%. Die Phasentoxizität von MTBE scheint hier zusätzlich zur Inaktivierung der BAL beizutragen. Bei Halbwertszeiten von 100 Stunden im emulgierten System ohne Substratzugabe wird deutlich, dass die Inaktivierung durch das Substrat den größten Einfluss auf die Enzyminaktivierung hat (Kühl, 2009, Zehentgruber, 2006).

Besonders interessant in diesem Zusammenhang sind auch die Studien von van den Wittenboer. Sie analysierte die Lagerstabilität der BAL mit organischen Lösungsmitteln in zweiphasigen Systemen, ohne die Phasen zu vermischen und verglich diese mit der Prozessstabilität (Tabelle 1). Dabei verwendete sie, im Gegensatz zu anderen Studien, nicht nur Lösungsmittel gegenüber denen die BAL eine hohe Toleranz aufweist. Während die Lagerstabilität sehr unterschiedlich war, war die Prozessstabilität in allen drei Systemen untereinander vergleichbar und gegenüber den Lagerstabilitäten sogar teilweise verbessert. Aus ihren Beobachtungen schloss van den Wittenboer, dass die Phasentoxizität zumindest mit 2-Oktanon und Toluol gegenüber den inaktivierenden Effekten durch die Reaktanden in den Hintergrund treten (van den Wittenboer, 2009).

Tabelle 1: Lager- und Prozessstabilität der BAL im Zweiphasensystem (van den Wittenboer, 2009)

Lösungsmittel	Halbwertszeit [h]	
	Lagerstabilität	Prozessstabilität
MTBE	14,9 ± 2,9	1,5 ± 0,1
2-Oktanon	0,6 ± 0,5	1,4 ± 0,1
Toluol	0,2 ± 0,1	2,0 ± 0,1

Durch kovalente Modifikation der BAL mit den Polymeren mPEG₇₅₀ und mPEG₂₀₀₀ bzw. gezielte Mutagenesen in besonders flexiblen Proteinbereichen konnte teilweise eine

Stabilisierung gegenüber organischen Lösungsmitteln (ein- und zweiphasig) erreicht werden. Im zweiphasigen Reaktionsprozess waren die Halbwertszeiten jedoch mit der nativen BAL vergleichbar. Um eine Stabilisierung der BAL für die Anwendung im Zweiphasensystem zu erreichen, muss dementsprechend erst eine Stabilisierung gegenüber den aldehydischen Substraten untersucht werden (van den Wittenboer, 2009). Der Einfluss aromatischer Aldehyde auf die Inaktivierung der BAL, sowie Strategien zur Identifizierung der Enzym-inaktivierenden Effekte ist ein wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

2 Motivation und Zielsetzung

Die Benzaldehydlyase (BAL) aus *Pseudomonas fluorescens* stellt aufgrund ihrer hohen Ligaseaktivität und ihres breiten Substratspektrums ein besonderes Enzym in der Klasse der Thiamindiphosphat (ThDP)- abhängigen Enzyme dar (Müller *et al.*, 2009). In den letzten Jahren wurden mit der BAL eine Reihe von Analysen in wässrig-organischen Zweiphasensystemen durchgeführt (Kapitel 1.5.2). Dies ermöglichte das Arbeiten bei höheren Substrat- und Produktkonzentration, im Vergleich zum einphasigen System mit DMSO und MTBE als Kosolventien. Allerdings wurde in ein- sowie zweiphasigen Systemen unter Prozessbedingungen eine um ein Vielfaches verminderte Stabilität gegenüber den entsprechenden Lagerstabilitäten ohne Substratzugabe beobachtet (Kapitel 1.4.4.3 und 1.5.2). Die Angaben für die Inaktivierung unter Prozessbedingungen variieren zwischen einer um das 4-50-fach beschleunigten Inaktivierung. Insgesamt weichen die Stabilitätsangaben in reinem Puffer, bei Verwendung von Kosolventien, organischen Lösungsmitteln als zweiter Phase oder unter Prozessbedingungen von Studie zu Studie stark voneinander ab. Außerdem wurden die einzelnen Faktoren, welche die Enzymstabilität in gerührten Emulsionssystemen beeinflussen können, nie getrennt voneinander untersucht. Um qualitative und quantitative Aussagen über den Einfluss der verschiedenen Faktoren, insbesondere der aromatischen aldehydischen Substrate, in einem emulgierten Zweiphasensystem auf die Stabilität der BAL treffen zu können, sollten diese getrennt voneinander analysiert werden.

Hierbei sollte besonders die Inaktivierung durch den Rührvorgang selbst, die molekulare Toxizität sowie Grenzflächentoxizität eines geeigneten organischen Lösungsmittels untersucht und anschließend mit der Substratstabilität gegenüber aromatischen Aldehyden verglichen werden. Bei Bestätigung der bisherigen Beobachtung, dass die Aldehyde das Hauptproblem der Inaktivierung der BAL darstellen, sollte dieser Aspekt hinsichtlich der molekularen Ursachen analysiert werden. Verschiedene Parameter, wie die Substitutionen am aromatischen Ring, pH oder die potentielle Reaktivierbarkeit sollten betrachtet werden, um so Hinweise auf mögliche Inaktivierungsprozesse zu erhalten.

Darüber hinaus sollte die der BAL strukturell sehr ähnliche Benzoylformiatdecarboxylase-Variante BFDH281A in die Untersuchungen mit einbezogen werden, um mittels möglicher Parallelen oder Unterschiede in der Inaktivierung Rückschlüsse auf potentielle strukturelle Merkmale, welche maßgeblich für die Inaktivierung sein könnten, ziehen zu können.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Enzyme

Tabelle 2: Chemikalien und Enzyme

Chemikalien	Bezugsquelle	
Acetonitril (HPLC <i>grade</i>)	Biosolv	Graz, Österreich
Bovines Serum Albumin (BSA)	Fermentas	St. Leon-Rot, Deutschland
Bradford-Lösung	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
	Sigma	St. Louis, USA
Ethidiumbromid	Biorad	München, Deutschland
Methanol (HPLC <i>grade</i>)	Biosolv	Graz, Österreich
Nicotinamid-adenin-dinukleotid (NADH)	biomol	Hamburg, Deutschland
Ni ²⁺ -Nitrilotriessigsäure (Ni ²⁺ -NTA)	Qiagen	Hilden, Deutschland
Polyethylenglykol (PEG)	400 Hüls AG	Marl, Deutschland
Triethanolamin	Riedel-de Haën	Hannover, Deutschland
Enzyme	Bezugsquelle	
Lysozym aus Hühnereiweiß	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Alkoholdehydrogenase (aus Pferdeleber)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Längenstandards	Bezugsquelle	
Gene Ruler 1kb DNA <i>ladder</i> (<i>ready-to-use</i>)	Fermentas	St. Leon-Rot, Deutschland
Page Ruler Plus Prestained Protein <i>ladder</i>	Fermentas	St. Leon-Rot, Deutschland

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in p.A.-Qualität von folgenden Firmen bezogen: Fluka (Sternheim, Deutschland), Gerbu (Gaiberg, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

3.1.2 Geräte

Tabelle 3: Geräte. Alle nicht aufgeführten Geräte entsprechen den allgemeinen Laborstandards

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Agarosegelelektrophorese	Consert	EV243/E143
	Pharmacia	LKB GPS 200/400
	Advance	Mupid-exu
Autoklaven	Systec	DX65
	H+P	Varioklav V1500
Bilddokumentation	Stratagene	Eagle Eye II
Dünnschicht Chromatographie	Merk	Kieselgel 60 F254
Externes Thermometer	Amarell	ama-digit ad 15 th
Externe Pumpe	Divac	24l
Feinwaage	Sartorius	CP 224-S
	Sartorius	BP 211-D

Fluoreszenzphotometer	Horiba Jobin Yvon (IBT)	Fluorog3-22
	Perkin Elmer (IMET)	LS-50B
Flüssigchromatograph	Amersham Bioscience	Äkta basic
	Amersham Bioscience	Äkta Purifier
HPLC	Agilent Technologies	Agilent 1100
	Dionex	ASI 100
HPLC –Chromatographie-Säulen	Agilent	Eclipse XDB-C18
	Crawford scientific	Chiralcel OD-H
Gefriertrockner	Steris	Lyovac GT2
	Martin Christ	Alpha 2-4
Heizschrank	Memmert	
Magnetrührer	IKA Labortechnik	RCT basic
Millipore Anlage	Millipore Corporation	Milli-Q
pH-Elektrode	Nordantec GmbH	pH Electrode IJ44
	Metrohm	Solvotrode
pH-Meter	Knick	pH Meter 766 Calimetric
	Metrohm	pH Meter 691
Pipetten	Eppendorf	research
Rotoren	Beckmann	JA-20
	Beckmann	JIA- 8.100
Rotationsverdampfer	Büchi	R114
Schüttelinkubator	Infrons HAT	Multitron
Schüttler	IKA Labortechnik	KS 250 basic
SDS-Stromgerät	BioRad	1000/500 Power supply
	BioRad	Power Pac 300
Sonotroden	Dr. Hielscher GmbH	S1, S3, SD14
Spektrophotometer	Beckmann	DU 650
	Shimadzu	UV1601
Sterilfiltrierer	Sartorius	
Thermomixer	Eppendorf	Thermomixer comfort
Ultraschallbad	Bandelin	Sonorex
Ultraschallprozessor	Dr. Hielscher GmbH	UP 200S
UV-Tisch	Bio-Budget	40-ECX-20L
Vortexer	Heiporph	Reax 2000
	Vortex	Genie 2
Zentrifugen	Eppendorf	Mini Spin
	Heraeus	Biofuge pico
	Hettich	Rotina 35R
	Beckmann	Coulter GS15-R
	Dupont	Sorvall RC-5B/RC-5B plus

3.1.3 Computerprogramme und Datenbanken

Tabelle 4: Verwendete Computerprogramme und Datenbanken

Bezeichnung	Hersteller oder Referenz
ChemDraw 10.0	CambridgeSoft (Cambridge, USA)
Clone Manager 7	Scientific & Educational Software (Cary, USA)
FL WinLab	Perkin Elmer (Waltham, USA)

Material & Methoden

FluorEssence™ 3.0 basiert auf Origin 8	Inkl. Multigroup 1.0 von Horiba Jobin Yvon (Minami-ku Kyoto, Japan)
ISI Web of Knowledge	http://apps.isiknowledge.com
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
ORIGIN 7 und 8.0	Microcal Software Inc. (Northampton, USA)
PDBe	http://www.ebi.ac.uk/pdbe/
PyMOL 0.99rc6	De Lano Scientific LLC (Palo Alto, Kanada)
ROPKA 2.0	http://propka.ki.ku.dk/
Unicorn 5.10	GE Healthcare (München, Deutschland)

3.1.4 Bakterienstämme

Tabelle 5: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ , φ80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(r _K ⁻ , m _K ⁺), phoA, supE44, thi-1, gyrA96, relA1, λ ⁻	Invitrogen
<i>E. coli</i> SG13009	F ⁻ ompT, hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) dcm, gal, (DE3)	Qiagen

3.1.5 Plasmide

Plasmid	Merkmal	Bezugsquelle
pkk233_2	AmpR-Promotor, trc-Pomotor, pBR322-ori, Amp ^R	Clontech (Mountain View, USA)
BALHis/ pKK233_2	pKK233_2 mit inseriertem Gen für BALwt mit C-terminalem Hexahistidin-Tag	Janzen 2006
HisBALΔ/ pKK233_2	BALHis mit C-terminaler Deletion (551-563 AS), N-terminal verlagertem Hexahistidin-Tag und eingefügter FaktorXa Erkennungssequenz	Kocot 2010
BALΔHis/ pKK233_2	BALHis mit C-terminaler Deletion (551-563 AS)	Kocot 2010
BFDH281AHis/ pKK233_2	pKK233_2 mit inseriertem Gen für BFDH281A mit C-terminalem Hexahistidin-Tag	Polovnikova 2003
BAL K127A pKK233_2	BALHis mit Mutation die zum Austausch der Aminosäure Lysin zu Alanin an der Position 127 führt	Sloning Biotechnologie (Deutschland)
BAL K127R pKK233_2	BALHis mit Mutation die zum Austausch der Aminosäure Lysin zu Arginin an der Position 127 führt	Sloning Biotechnologie (Deutschland)
BAL K127N pKK233_2	BALHis mit Mutation die zum Austausch der Aminosäure Lysin zu Asparagin an der Position 127 führt	Sloning Biotechnologie (Deutschland)
BAL K127E pKK233_2	BALHis mit Mutation die zum Austausch der Aminosäure Lysin zu Glutamat an der Position 127 führt	Sloning Biotechnologie (Deutschland)
BAL K127Q pKK233_2	BALHis mit Mutation die zum Austausch der Aminosäure Lysin zu Glutamin an der Position 127 führt	Sloning Biotechnologie (Deutschland)
BAL K127I pKK233_2	BALHis mit Mutation die zum Austausch der Aminosäure Lysin zu Isoleucin an der Position 127 führt	Sloning Biotechnologie (Deutschland)
BAL K127L pKK233_2	BALHis mit Mutation die zum Austausch der Aminosäure Lysin zu Leucin an der Position 127 führt	Sloning Biotechnologie (Deutschland)
BAL K127M pKK233_2	BALHis mit Mutation die zum Austausch der Aminosäure Lysin zu Methionin an der Position 127 führt	Sloning Biotechnologie (Deutschland)

3.2 pH-Messung

3.2.1 pH-Messung in rein wässrigen Puffern

Die pH-Messung in rein wässrigen Puffern wurde mit einer Standardelektrode (pH Elektrode IJ44, Nordantec GmbH, Deutschland) nach Kalibrierung mit Pufferlösungen (Carl Roth GmbH, Deutschland) durchgeführt. Die pH-Angaben der Puffer in der vorliegenden Arbeit beziehen sich auf die Messung vor Zugabe von organischen Lösungsmitteln (DMSO, MTBE und MIBK).

3.2.2 pH-Messung nach Zugabe organischer Substanzen

Da in Kaliumphosphatpuffer (Kpi) nach DMSO Zugabe eine Präzipitation von Magnesiumphosphat beobachtet wurde, wurde ein anderes Puffer System gewählt. Für Kpi-Puffer wurde bereits zuvor eine pH-Verschiebung nach Zugabe von DMSO beschrieben (Kapitel 1.5.1). Ob ein solcher Effekt auch in dem gewählten Puffer System (Triethanolamin, TEA) vorliegt, wurde geprüft. Hierfür wurde eine pH-Elektrode verwendet, welche speziell für die Anwendung in organischen Lösungsmitteln hergestellt wird (Solvotrode, Metrohm, Deutschland). Diese ist stabiler gegenüber organischen Lösungsmitteln und besitzt einen zusätzlichen Schutz vor starken Spannungsschwankungen, welche durch organische Lösungsmittel hervorgerufen werden können (persönliche Mitteilung Metrohm Kundenservice, Deutschland). Die Elektrode wurde bewusst in rein wässrigen Pufferlösungen (Carl Roth GmbH, Deutschland) kalibriert, um eventuelle Unterschiede zwischen Puffer und Puffern mit Kosolventien zu ermitteln. TEA Puffer (50 mM TEA, pH 8, 2,5 mM MgSO_4 , 0,5 mM ThDP) wurde mit 30 vol% DMSO versetzt und die Solvotrode für mindestens 10 Minuten oder länger (bis keine pH-Änderung mehr angezeigt wurde) in die Lösung eingetaucht. Zusätzlich wurde der pH-Wert in Anwesenheit von Benzaldehyden (Benzaldehyd, 2-Chlor-, 3-Methoxybenzaldehyd) ermittelt. In keinem Fall konnte ein Unterschied nach Zugabe der Substanzen ermittelt werden.

3.3 Kultivierung von Bakterienstämmen

3.3.1 Nährmedien

LB-Medium (Sambrook & Russell, 2001):

10	g/L	Trypton oder Pepton
10	g/L	Natriumchlorid
5	g/L	Hefeextrakt

LB-Platten:

15	g/L	Agar
----	-----	------

Alle Flüssig- und Festmedien wurden 20 min bei 121°C und einem Druck von 200 kPa autoklaviert. Für die Anzucht der Bakterienstämme unter Plasmid-kodiertem Selektionsdruck wurde hitzelabiles Ampicillin [100 µg/ml] oder Kanamycin [50 µg/ml] vor der Verwendung sterilfiltriert (Membranfilter, Porendurchmesser $\leq 0,2$ µm, Schleicher & Schüll, Dassel) und dem autoklavierten Medium bei einer Temperatur ≤ 60 °C zugesetzt.

3.3.2 Kultivierung von Flüssig- und Plattenkulturen

E. coli-Zellen wurden immer frisch mit dem jeweiligen Plasmid transformiert (Kapitel 3.4.5), mittels Drigalski-Spatel auf LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bakterienstämme mit Plasmid-kodierender Antibiotikaresistenz wurden unter entsprechendem Selektionsdruck kultiviert. Kulturmengen bis zu 5 ml wurden in sterilen Reagenzgläsern, größere Kulturmengen in Erlenmeyerkolben bei 30 °C – 37 °C und 120 Upm über Nacht inkubiert.

3.3.3 Kultivierung von Proteinexpressionskulturen

Proteinexpressionskulturen wurden in 1 L LB-Medium (Kapitel 3.3.1) in 5 L Erlenmeyerkolben angezogen. Kulturen in kleinem Maßstab (10 ml) wurden in 50 ml Erlenmeyerkolben angezogen. Die Kulturen wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,05 – 0,2 aus einer Vorkultur inokuliert und bei 37 °C und 120 Upm inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,3 – 0,7 durch Zugabe von 1 mM IPTG. Anschließend wurden die Kulturen für 4 – 17 h bei 30 °C - 37 °C bis zur Zellernte im Schüttler inkubiert.

3.3.4 Hochzelldichtekultivierung

HZD-Batch:			Spurenelementlösung:			Vitaminlösung:		
2	g/L	NH ₄ Cl	10	g/L	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,1	g/L	Riboflavin
20	g/L	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	g/L	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	10	g/L	Thiamin-HCl
130	g/L	KH ₂ PO ₄	0,25	g/L	CuSO ₄ · 2 H ₂ O	0,5	g/L	Nicotinsäure
100	g/L	K ₂ HPO ₄	2,5	g/L	MnSO ₄ · H ₂ O	0,5	g/L	Pyridoxin-HCl
60	g/L	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	1,75	g/L	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,5	g/L	Ca-Phanthotenat
30	g/L	Hefeextrakt	0,125	g/L	H ₃ BO ₃	0,001	g/L	Biotin
			2,5	g/L	AlCl ₃ · 6 H ₂ O	0,002	g/L	Folsäure
			0,5	g/L	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,01	g/L	Cyanocobalamin
			10	g/L	FeSO ₄ · 7 H ₂ O			
HZD-Feed:			Antibiotika-Lösungen:			Glucose-Batch:		
500	ml	HZD-Batch	200	g/L	Ampicillin	400	g/L	Glucose
+ 75	g/L	Hefeextrakt	75	g/L	Kanamycin			
MgSO ₄ -Lösung:			Thiamin-Lösung:			Glucose-Feed:		
200	g/L	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	200	g/L	Thiamin-HCl	717	g/L	Glucose
IPTG-Lösung:								
233	g/L	IPTG						

Die Lösungen HZD-Batch, HZD-Feed, MgSO₄-Lsg., Glucose-Batch und Glucose-Feed wurden getrennt voneinander autoklaviert. Durch ihren niedrigen pH-Wert war die Spurenelemente-Lösung autosteril. Die übrigen Lösungen wurden mittels eines Membranfilters (0,2 µm, Carl Roth) sterilisiert. Aus den aufgeführten Komponenten wurden folgendermaßen ein Batch-Medium und eine HZD-Feed-Lösung zusammengestellt:

Batch-Medium:			HZD-Feed-Lösung:		
1000	ml	HZD-Batch	500	ml	HZD-Feed
50	ml	Glukose-Batch	4,18	L	Glucose-Feed
50	ml	MgSO ₄ -Lsg.	250	ml	MgSO ₄ -Lsg.
40	ml	Spurenelement-Lsg.	20	ml	Spurenelement-Lsg.
50	ml	Vitamin-Lsg.	25	ml	Vitamin-Lsg.
5	ml	Thiamin-Lsg.	25	ml	Thiamin-Lsg.
3	ml	Antischaum (Antifoam, Sigma AF 289)	2	ml	Antischaum (Antifoam, Sigma AF 289)
8,7	L	VE-Wasser			

Die Hochzelldichte- (HZD)-Kultivierung pKK233_2_BALHis Plasmid tragender Bakterienkulturen erfolgte im 15 L Maßstab in einem Techfors I-Fermenter (40 L) entsprechend dem Protokoll von (Korz *et al.*, 1995). 10 L Batch-Medium wurden mit 100 ml einer Vorkultur inokuliert. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C, der pH-Wert wurde konstant bei pH 7,0 gehalten und wenn nötig mit 25% (v/v) NH₃ oder 85% (v/v) H₃PO₄ titriert. Über den gesamten Zeitraum der Fermentation wurde kontinuierlich HZD-Feed-Lösung zugeführt. Der Sauerstoffpartialdruck zwischen 30 und 40% wurde konstant eingehalten. Die Induktion der

Expression erfolgte nach ca. 27 h mit 2 mM IPTG. Die Zellernte erfolgte ca. 14 h nach Induktion.

3.3.5 Bestimmung der Zelldichte

Zur Messung des Zellwachstums wurde die optische Dichte (OD) einer Kultur in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm relativ zum jeweiligen Medium bestimmt. Eine OD₆₀₀ von 1 entsprach etwa 10⁹ Zellen/ml.

3.3.6 Proteinexpression der BAL-Varianten

Die bei Sloning Biotechnologie mit Sitz in München in Auftrag gegebenen Varianten wurden als lyophilisierte Plasmid-DNA (ca. 1,5-3 µg) geliefert. Die DNA wurde in 10-20 µl Nuklease freiem Wasser aufgenommen und ein Teil 1:10 verdünnt (ca. 15 ng/µl). Je 200 µl transformationskompetente *E. coli* SG13009 Zellen wurden mit 1 µl der Plasmid DNA transformiert (Kapitel 3.4.5) und die BAL-Varianten anschließend überexprimiert (Kapitel 3.3.3) und gereinigt (Kapitel 3.6).

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA in geringen Mengen wurde aus 1,5 – 5 ml *E. coli*-Kulturen (Kap. 3.2.2) gemäß den Herstellerangaben mit dem „Gene JET Plasmid Miniprep Kit“ (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) durchgeführt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte in Millipore-H₂O. Wurden größere Mengen an DNA benötigt, so wurde die Präparation aus einer 50-100 ml Kultur mit dem „Qiagen High speed Plasmid Midi Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) oder dem „NucleoBond Xtra Midi“-Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte auch hier in Millipore-H₂O.

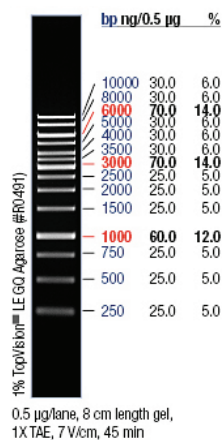
3.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

TBE-Puffer (5x):			Probenpuffer (5x):		
89	mM	Tris/HCl	100	mM	Na ₂ -EDTA
89	mM	Borsäure	43	% (v/v)	Glycerin
0,5	mM	Na ₂ -EDTA	0,05	% (w/v)	Bromphenolblau

Ethidiumbromid-Lösung:

0,1-0,5 µg/ml Gel Ethidiumbromid

Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente ist abhängig von ihrem Molekulargewicht, ihrer Konformation, der Konzentration des Agarosegels und der Stärke des elektrischen Feldes. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente erfolgte die Auftrennung in 1% – 2%igen Agarosegelen. Hierfür wurde die entsprechende Menge Agarose (w/v) in 0,5x TBE-Puffer aufgekocht und mit Ethidiumbromid-Lösung versetzt. Die DNA-Proben wurden mit 20% 5x DNA-Probenpuffer versetzt und anschließend in die Taschen eines horizontalen Agarosegels pipettiert. Die Elektrophorese fand in Gelkammern bei einer auf 60 mA limitierter Stromstärke sowie konstanten Spannungen zwischen 8 und 12 V/cm, bezogen auf die Länge des Gels statt. Als Laufpuffer diente 0,5x TBE-Puffer. Bei jedem Gel wurde der Längenstandard „Gene Ruler 1kb DNA ladder“ (Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) mitgeführt.

3.4.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen von DNA-Proben wurden mittels analytischer Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.4.2) anhand des Längenstandards „Gene Ruler 1kb DNA ladder“ (Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland), welcher distinkte Mengen an DNA beinhaltet, abgeschätzt.

Abb. 15: Gene Ruler 1 kb DNA ladder.

Quelle: <http://www.fermentas.com>

3.4.4 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen**TMF-Puffer:**

100 mM CaCl₂
50 mM RbCl
40 mM MnCl₂

Mg²⁺-Mix:

500 mM MgCl₂
500 mM MgSO₄

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurde eine 5 ml Vorkultur (Kapitel 3.3.2) des entsprechenden Bakterienstammes über Nacht angezogen. Anschließend wurden 50 ml LB-Medium (Kapitel 3.3.1) mit 0,5 ml der Vorkultur inokuliert, mit 1 ml Mg^{2+} -Mix versetzt und bis zu einer OD_{600} von 0,5–0,7 bei 37 °C inkubiert. Nach Sedimentation der Zellen mittels Zentrifugation (15 min, 5000 Upm, 4 °C), wurde das Sediment in 50 ml eiskaltem TMF-Puffer vorsichtig resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 min, 4000 Upm, 4 °C) wurde das Zell-Sediment in 4 ml eiskaltem TMF-Puffer aufgenommen und mit 1 ml sterilem Glycerin versetzt. Aus der Zell-Glycerin-Suspension wurden 200 µl Aliquots pipettiert, welche bei -80°C gelagert wurden

3.4.5 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Für eine chemische Transformation wurden 1–5 µl Plasmid-DNA mit 200 µl kompetenten *E. coli*-Zellen (Kapitel 3.4.4) gemischt (Hanahan, 1983). Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock von 90 Sek bei 42 °C. Im Anschluss wurden die Transformationsansätze 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 700 µl LB-Medium (Kapitel 3.3.1) erfolgte die phänische Expression für 1–2 h bei 37 °C auf einem Brutroller. Die Transformationsansätze wurden mit einem Drigalski-Spatel zu 1/10 und zu 9/10 auf selektiven LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C aerob inkubiert.

3.4.6 Sequenzierung von DNA

Alle Sequenzierungen wurden als Auftragsarbeiten von der Firma Sequiserve (Vaterstetten, Deutschland) durchgeführt.

3.5 Proteinchemische Methoden

3.5.1 Zellaufschluss mittels Sonifikation

Der Aufschluss von Zellmaterial zur Freisetzung intrazellulärer, rekombinanter Proteine aus Proteinexpressionskulturen (Kapitel 3.3.3) oder Hochzelldichte-Kultivierung (Kapitel 3.3.4) erfolgte mittels Ultraschallbehandlung oder in Kombination mit einem enzymatischen Zellaufschluss mittels Lysozym und anschließender Ultraschallbehandlung. Hierzu wurden 20% (w/v) der bei -20 °C gelagerten Zellen in 50 mM Kpi-Puffer pH 6,5 -7,0 (mit 2,5 mM $MgSO_4$ und 0,1 mM ThDP) resuspendiert. Lysozym wurde in einer Konzentration von 1

mg/ml zugegeben und die Lösung 30 min auf Eis unter Rühren inkubiert. Lysozym spaltet die β -(1 \rightarrow 4)-glykosidische Bindung zweier Peptidoglycanmoleküle im Mureinnetz der Bakterienzellwand, wodurch die Zellwand ihre Stabilität verliert. Die Ultraschallbehandlung erfolgte mit einer Beschallung von 4 x 1–5 min auf Eis und analogen Pausen (Ultraschallprozessor UP 200S und Sonotroden S1, S3, SD14, Dr. Hielscher GmbH, Telthof, Deutschland). Der Desintegrator wurde auf 70% der Maximalamplitude und einen Zyklus von 0,5 eingestellt. Anschließend wurden unlösliche Zellbestandteile mittels Zentrifugation sedimentiert (45 min, 18.000 Upm, 4 °C). Der Überstand, welcher die löslichen Zellbestandteile inklusive des rekombinanten Enzyms enthält, wurde entweder direkt als Rohextrakt für Proteinreinigungen (Kap. 3.6.1) eingesetzt oder für die spätere Verwendung bei -20 °C gelagert, wobei die Lagerung nie länger als 1 Woche betrug.

3.5.2 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford

Bradford-Lösung:

100	mg/ml	Coomassie Brilliant Blau G250
50	ml/L	Ethanol _{abs.}
100	ml/L	<i>ortho</i> -Phosphorsäure (85%)

Die Bestimmung der quantitativen Proteinkonzentration nach Bradford ist ein kolorimetrisches Verfahren und beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie-Brilliant Blau G250, einem Triphenylmethan-Farbstoff, in saurer Lösung von 465 nm nach 595 nm. Die Bindung des Farbstoffes erfolgt unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten von Proteinen, wobei die Intensität des Farbkomplexes direkt vom Proteingehalt abhängig ist. Bei dieser Methode wird die Proteinkonzentration einer unbekannten Probe relativ zu einem Protein (bovines Serum Albumin, BSA) bekannter Konzentration bestimmt. 100 μ l Protein-Probe wurde mit 900 μ l Bradford-Lösung versetzt, vermischt und für 10 min abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Als Referenz dienten 900 μ l Bradford-Lösung mit 100 μ l des jeweiligen Puffers. Die Absorption des entstandenen Proteinkomplexes wurde bei 595 nm gemessen. Anhand der Kalibriergeraden von BSA konnte die Proteinkonzentration der Probe berechnet werden.

Für die Herstellung eigener Bradford-Lösung wurde Coomassie Brilliant Blau G250 in Ethanol_{abs.} gelöst und anschließend mit *ortho*-Phosphorsäure versetzt. Die Lösung wurde für eine Stunde gerührt, anschließend mit Millipore-H₂O auf einen Liter aufgefüllt und über Nacht gerührt. Am folgenden Tag wurde die Lösung durch einen Faltenfilter (240 mm,

Schleicher & Schuell) filtriert und in einer lichtgeschützten Flasche gelagert. Neben der selbst hergestellten Bradford-Lösung wurden ebenfalls käuflich erworbene Bradford-Lösungen genutzt (AppliChem, Darmstadt, Deutschland oder Sigma, St. Louis, USA).

3.5.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Trenngel 12% (2 für Minigele):

4	ml	Rotiphorese® Gel 30 (30% Acrylamid, 0,8% N,N'-Methylenbisacrylamid)
2,5	ml	1,5 M Tris/HCl pH 8,8
3,4	ml	Millipore H ₂ O
100	µl	10% SDS (w/v)
100	µl	10% APS (w/v)
10	µl	TEMED

Sammelgel 5% (für 2 Minigele):

0,83	ml	Rotiphorese® Gel 30 (30% Acrylamid, 0,8% N,N'-Methylenbisacrylamid)
1,3	ml	0,5 M Tris/HCl pH 6,8
2,8	ml	Millipore H ₂ O
50	µl	10% SDS (w/v)
50	µl	10% APS (w/v)
10	µl	TEMED

Elektrophorese-Puffer:

250	mM	Tris Ultra
1,92	M	Glycin
1	%	SDS (w/v)

SDS-Probenpuffer (5x):

0,5	M	Tris/HCl pH 6,8
10	%	Glycerin (v/v)
4	%	SDS (w/v)
2	%	β-Mercaptoethanol
0,03	%	Bromphenolblau

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinproben erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem. Tris-Glycin Gele nach dem Laemmli-System (Laemmli 1970) wurden selbst hergestellt. Hierfür wurden die einzelnen Komponenten miteinander vermischt, wobei die Zugabe von APS und TEMED erst kurz vor Befüllung der Gelkammern erfolgte. Die Gele wurden in der vertikalen Gelapparatur „Mini Protean II Dual Slap Cell“ (Biorad, München, Deutschland) verwendet. Die Protein-Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, 5–10 min bei 98 °C vollständig denaturiert und anschließend elektrophoretisch getrennt oder bei -20 °C gelagert.

Kommerziell erworbene „NuPAGE® Novex“ 4-12% Bis-Tris-Gradienten Gele (Invitrogen, Paisley, England) wurden gemäß Herstellerangaben, mit den zugehörigen Puffern und der vertikalen Gelapparatur „XCell SureLock™ Mini-Cell“ verwendet. Die Elektrophorese

erfolgte bei konstanten 100 bzw. 200 V. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die SDS-Gele gefärbt (Kapitel. 3.5.4) und dokumentiert.

3.5.4 Färbung von SDS-Gelelen

3.5.4.1 Färben von SDS-Gelelen mittels Coomassie

Coomassie-Färbelösung			Entfärbelösung		
50	%	Ethanol _{tech} (v/v)	40	%	Ethanol _{tech} (v/v)
10	%	Essigsäure	10	%	Essigsäure (v/v)
0,1	%	Coomassie Brilliant Blau G250 (w/v)			

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die SDS-Gele für entweder in „Simply Blue safe stain“ (Invitrogen, Paisley, England) oder in Coomassie-Färbelösung (Merril, 1990) für mind. 2 h geschwenkt. Anschließend wurde die Färbelösung gegen eine Entfärbelösung oder bei „Simply Blue safe stain“ gefärbten Gelen gegen deionisiertes Wasser getauscht. In beiden Fällen wurde die Entfärbelösung bzw. das deionisierte Wasser etwa alle 20–30 min gewechselt, bis die proteinfreien Bereiche komplett entfärbt waren. Danach wurden die Gele eingescannt und bei Bedarf zur Lagerung bei 4 °C in Folie eingeschweißt.

3.5.4.2 Färben von SDS Gelen mittels Silberfärbung

Die Silberfärbung sowie die anschließende Entfärbung der SDS-Gele, nach Auftrennung der Proteine, erfolgten mittels des SilverXpress Staining Kit (Invitrogen, Paisley, England) gemäß Herstellerangaben.

3.6 Reinigung und Lagerung rekombinanter Proteine

3.6.1 Reinigung mittels Immobilisierter Metallaffinitätschromatographie über eine Ni²⁺-NTA-Matrix

Aufschlusspuffer pH 6,5-7:			Äquilibrierungspuffer pH 7		
50	mM	Kpi	50	mM	Kpi
2,5	mM	MgSO ₄	2,5	mM	MgSO ₄
0,1	mM	ThDP	0,1	mM	ThDP
Waschpuffer pH 7,2-7,5			Elutionspuffer pH 7,5-7,8		
50	mM	Kpi	50	mM	Kpi
2,5	mM	MgSO ₄	2,5	mM	MgSO ₄
0,1	mM	ThDP	0,1	mM	ThDP
50	mM	Imidazol	250	mM	Imidazol

Alle Puffer wurden sterilfiltriert und entgast.

Säulenvolumen: 12 ml (5 L Kulturen, Kapitel 3.3.3) und 61 ml (Hochzelldichtekultivierung, Kapitel 3.3.4)

Flussrate: 1-3 ml/min

Die Reinigung rekombinanter C- oder N-terminaler Hexahistidin-Fusionsproteine erfolgte unter nativen Bedingungen mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatographie (IMAC; (Porath *et al.*, 1975). Das Prinzip der IMAC beruht auf einer stabilen Interaktion von Ni^{2+} -Ionen und Nitrilotriessigsäure- (NTA)-Liganden, welche auf einer Agarosematrix immobilisiert sind. Die Ni^{2+} -Ionen können im Austausch gegen Wasser mit zwei Histidinresten interagieren und so zwei Fusionsproteine binden (Hochuli, 1988, Janknecht *et al.*, 1991). Gebundene Proteine können durch die Protonierung der interagierenden Aminosäureketten oder durch Metall-bindende Liganden, wie Imidazol (Teil der Histidin-Seitenkette), eluiert werden. Zu Beginn einer Reinigung wurde eine Ni^{2+} -NTA-Säule mit dem 2-3 fachen Volumen Äquilibrationpuffer gespült. Anschließend wurde der Rohextrakt aufgetragen. Nach Bindung des Zielproteins an die Ni^{2+} -NTA-Matrix wurden ungebundene Proteine mit Äquilibrationpuffer von der Säule gespült (Durchlauf). Durch die anschließende Waschküpperspülung mit geringer Imidazolkonzentration wurden unspezifisch gebundene Proteine von der Ni^{2+} -NTA-Matrix eluiert. Die gebundenen Proteine wurden mit Elutionspuffer und dem darin enthaltenen Imidazol von der Matrix verdrängt. An diese Reinigung schloss sich direkt eine Entsalzung durch Größenausschlusschromatographie (Kapitel 3.6.2) an, um das Imidazol aus der Proteinfraction zu entfernen. Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen mittels Bradford auf ihren Proteingehalt (Kapitel 3.5.2) und auf ihre Aktivität (Kapitel 3.9.1) hin untersucht.

3.6.2 Größenausschlusschromatographie mittels Sephadex G-25 Matrix

Entsalzungspuffer pH 6,5-7:

10	mM	Kpi
2,5	mM	MgSO_4
0,1	mM	ThDP

Alle Puffer wurden sterilfiltriert und entgast.

Säulenvolumen: 1 L

Flussrate: 5-15 ml/min

Probenvolumen: 20-100 ml

Die zuvor gereinigten Enzyme (Kapitel 3.6.1) wurden direkt im Anschluss mit Hilfe einer G-25 Matrix (GE Healthcare, München, Deutschland) entsalzt. Die Säule wurde mit dem 1,5-

2-fachen Volumen Entsalzungspuffer äquilibriert, die Probe aufgetragen und mit Entsalzungspuffer bis zur Elution des Proteins gespült. Geringe Probenmengen (bis 20 ml) wurden alternativ über PD-10 Säulen (GE Healthcare, München, Deutschland) nach Herstellerangaben unter Verwendung des Entsalzungspuffers entsalzt.

3.6.3 Lagerung gereinigter Proteine

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme wurden in gefriergetrockneter Form bei -20 °C gelagert. Für eine Gefriertrocknung (Lyophilisation) wurden die gereinigten und entsalzten Proteinfractionen (Kapitel 3.6.2) in einer flachen Glasschale mit maximal 1,5 cm Füllhöhe und maximal 1–1,5 mg/ml Proteinkonzentration bei -20 °C eingefroren. Die gefrorene Lösung wurde in einer Lyophille (Lyovac GT2 oder Alpha 2-4) gefriergetrocknet.

3.7 Synthese von Benzoin-Derivaten

Für die Ermittlung der spezifischen Ligase- und Lyaseaktivität (Kapitel 3.9.2.1 und 3.9.2.3) mussten die kommerziell nicht verfügbaren Benzoin-Derivate zuerst synthetisiert werden. Für die Synthese der Benzoin-Derivate wurde die BAL verwendet.

3.7.1 Synthese von 3,3',5,5'-Tetramethoxybenzoin

Reaktionspuffer pH 8:			Substratlösung (1 M):	
50	mM	Kpi	166,2	mg/ml 3,5-Dimethoxybenzaldehyd in MTBE
0,5	mM	MgSO ₄		
0,1	mM	ThDP	Enzymlösung:	
30	%	MTBE (v/v)	1	mg/ml BAL in Reaktionspuffer

Die Synthese von 3,3',5,5'-Tetramethoxybenzoin (TMBZ) wurde noch in Kpi-Puffer durchgeführt. Hier ergaben sich besonders bei Zugabe von DMSO Probleme durch Präzipitation von Magnesiumphosphat im schwach alkalischen Bereich (Kapitel 4.1.5). Deshalb wurde als zweites Lösungsmittel MTBE eingesetzt. Da MTBE aber nur zu etwa 5 vol% in Puffer löslich ist wurde ein 2-Phasen Reaktionsansatz gewählt um eine ausreichend hohe Konzentration des Substrats 3,5-Dimethoxybenzaldehyd (DMBA) einsetzen zu können. Zu 18,5 ml Reaktionspuffer wurden 5,5 ml MTBE, 120 µl Enzymlösung und 1 ml Substratlösung gegeben und über Nacht gerührt (600 Upm, 25 °C). Anschließend wurde die MTBE-Phase, welche den Großteil der aromatischen Aldehyde und Benzoinen enthält, unter Vakuum eingengt und auf eine präparative Dünnschichtchromatographieplatte (DC) aufgetragen.

Nach Trocknung der Platte wurde diese senkrecht in eine, mit Chloroform als Fließmittel (mobile Phase) gesättigte, Chromatographiekammer gestellt. Das DMBA war nach 2 Stunden Laufzeit deutlich vom TMBZ getrennt. Die Auftrennung konnte unter UV-Licht (254 nm) überprüft werden. Der entsprechende Bereich wurde von der Platte entnommen und das TMBZ mittels Ethylacetat aus dem Kieselgel gelöst. Trotz der Reinigung mittels DC, konnte nach HPLC-Analyse (Kapitel 3.8.1) ein geringer Anteil (ca. 0,8%) DMBA identifiziert werden. Das Ethylacetat wurde im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt. Das gewonnene TMBZ wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Spätere HPLC-Analysen zeigten, dass TMBZ nicht vollständig stabil ist und etwa 5% innerhalb weniger Tage autokatalytisch wieder zu DMBA zerfallen.

3.7.2 Synthese von 4,4'-Dichlorbenzoin

Reaktionspuffer pH 8:

50 mM TEA
2,5 mM MgSO₄
0,5 mM ThDP
30 % DMSO (v/v)

Enzymlösung:

1 mg/ml BAL in Reaktionspuffer

168 mg 4-Chlorbenzaldehyd (4-CIBA) wurden mit 10 ml Reaktionspuffer gemischt, 200 µl Enzymlösung zugegeben und über Nacht gerührt (600 Upm, 25 °C). Anschließend wurde das präzipitierte Produkt über eine Nutsche filtriert. Der Rückstand wurde zunächst mit kaltem Wasser gewaschen und das 4,4'-Dichlorbenzoin (4,4'-CIBZ) in Diethylether gelöst. 4-CIBA ist in Diethylether unlöslich und konnte so vollständig vom 4,4'-CIBZ getrennt werden, was durch HPLC-Analyse (Kapitel 3.8.1) bestätigt wurde. Das gewonnene 4,4'-CIBZ wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.8 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Mittels der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance/pressure liquid chromatography*, HPLC) können unter anderem chemische Komponenten voneinander getrennt, sowie mit Hilfe eines Standards identifiziert und quantifiziert werden. Normalerweise besteht das Säulenmaterial (stationäre Phase) aus druckresistenten Silica-Partikeln. Die Partikel können unbeschichtet, polar (normale Phase), apolar (Umkehrphase oder *reversed phase*, RP) oder mit einem Enantiomer (chirale Phase) beschichtet sein. Umkehrphasen sind mit Alkylketten einer bestimmten Kettenlänge besetzt (z.B. C₄, C₈ oder C₁₈). Unbesetzte polare Si-OH Gruppen der Silica-Partikel werden gedeckelt, z.B. indem sie

mit $\text{Si}(\text{CH}_3)$ -Gruppen umgesetzt werden. So sollen ungewollte Wechselwirkungen der zu trennenden Substanzen mit der polaren Oberfläche der Silica-Partikel (Si-OH -Gruppen), vor allem bei neutralen und alkalischen Puffern, vermieden werden. Bei chiralen Chromatographiesäulen werden die Partikel mit enantiomerenreinen Substanzen besetzt. Diese bilden mit dem zu analysierenden Enantiomeren unterschiedlich starke diastereomere Wechselwirkungen aus, wodurch es zu unterschiedlichen Retentionszeiten kommt. Beim Austritt aus der Säule werden die chemischen Komponenten mittels einer Fotodiodenzelle (*photo diode array detector*, DAD) detektiert.

3.8.1 Reversed-phase HPLC

Säule: Eclipse XDB-C18, 4,6 x 150mm, 5µm

Für die Trennung der aromatischen Benzaldehyd-Derivate und Benzoin-Derivate eignen sich besonders die hydrophoben C18-Umkehrphasen. Wenn möglich wurde für die mobile Phase ein Gemisch aus Acetonitril und Millipore-Wasser verwendet. Aufgrund der Wirtschaftskrise und dem daraus resultierendem Acetonitrilmangel, wurde alternativ auch ein Methanol und Millipore-Wasser Gemisch verwendet. In den meisten Fällen waren die Basislinientrennung und/oder die Peaksymmetrie gegenüber Acetonitril schlechter. Die zu analysierenden Proben wurden vor Auftrag in Isopropanol mit 0,7 vol% Perchlorsäure aufgenommen und 1-5 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Es wurden jeweils 10 µl Probe injiziert und bei einem Fluss von 1 ml/min analysiert. Die verwendeten Methoden, können der nachfolgenden Tabelle 6 entnommen werden.

Tabelle 6: Verwendete HPLC-Methoden zur Analyse der Benzaldehyde und die entsprechenden Benzoin

Benzaldehyd	Detektion bei Wellenlänge [nm]	Laufmittel Acetonitril [%]	Retentionszeiten [min]		Laufmittel Methanol [%]	Retentionszeiten [min]	
			BA	BZ		BA	BZ
Benzaldehyd	254	50	3,5	4,2	60	3,1	4,7
2-Methoxy	254	40	5,5	7,7	60	3,7	4,5
3-Methoxy	254	-	-	-	60	3,7	6
4-Methoxy	280	50	3,3	4,1	60	3,3	5,3
3,5-Dimethoxy	270	55	3,6	4,1	60	4,8	9
2-Fluor	250	50	3,8	4,5	-	-	-
3-Fluor	250	50	3,9	5,5	70	2,6	3,5
4-Fluor	250	50	3,6	5,2	70	2,4	3,4
3,5-Difluor	250	50	4,6	8,9	70	3	6,4
2,4-Difluor	250	50	4,2	6,3	70	2,8	3,7

2-Chlor	254	50	5,6	7,2	-	-	-
3-Chlor	254	70	2,7	3,3	-	-	-
4-Chlor	260	70	2,7	3,8	-	-	-
3,5-Dichlor	254	70	3,9	9,7	-	-	-
2-Brom	254	50	6,5	8,5	-	-	-
3-Brom	254	70	2,9	4,1	70	3,9	9,1
4-Brom	263	70	2,9	4,4	70	3,8	11,1
3,5-Dibrom	254	70	4,7	14,6	-	-	-
2-Tolyl	254	-	-	-	75	3,9	5
3-Tolyl	254	60	3,3	4,5	75	3,9	5,4
4-Tolyl	260	60	3,2	4,5	75	3,7	5,4
2-Nitro	254	50	3,5	k. U.	-	-	-
3-Nitro	254	50	3,4	5	-	-	-
4-Nitro	270	55	2,9	3,8	-	-	-

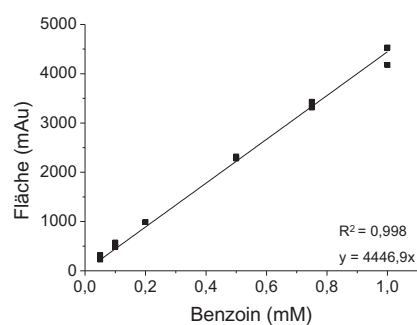
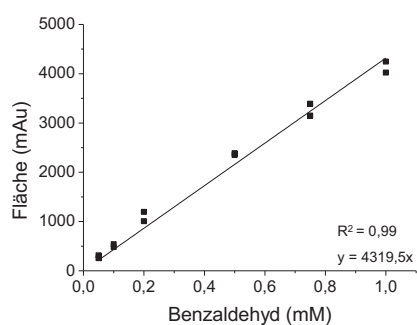
BA = Benzaldehyd-Derivat

BZ = Benzoin-Derivat aus Selbstligation

k. U. = kein Umsatz

3.8.1.1 Kalibrierung

Für Benzaldehyd, 4-Chlorbenzaldehyd und 3,5-Dimethoxybenzaldehyd, sowie die entsprechenden 2-Hydroxyketone Benzoin, 4,4'-Dichlorbenzoin und 3,3',5,5'-Tetramethoxybenzoin wurden Kalibrierungen durchgeführt. Dies ermöglichte die Quantifizierung dieser Substanzen in den untersuchten Ansätzen. Die Substanzen wurden in Konzentrationen von 0,02-2 mM in Isopropanol (inkl. 0,7% Perchlorsäure) aufgenommen und wie in Kapitel 3.8.1 beschrieben analysiert.



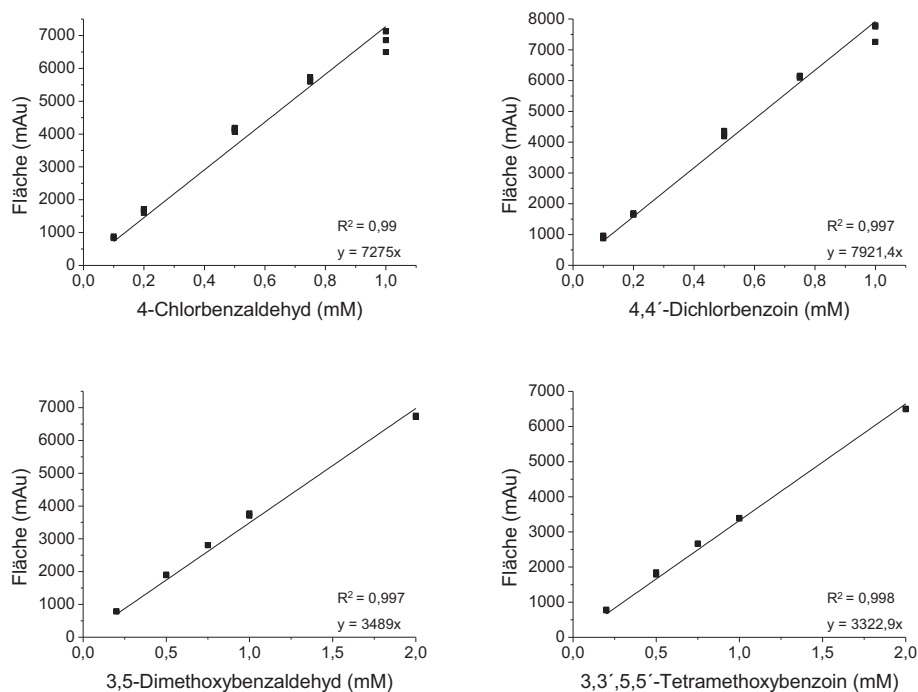


Abb. 16: Kalibriergeraden für verschiedene Benzaldehyd- und Benzoin-Derivate. Die Kalibrierungen wurden mit den entsprechenden HPLC-Methoden (Tabelle 6) mit Acetonitril als Laufmittel ausgeführt.

3.8.2 Chirale-Analytik

Säule: Chiralcel OD-H, 4,6 x 250 mm, 5 μ m

Laufmittel: 90:10 (v/v) n-Hexan : Isopropanol

Methode: 0,75 ml/min Fluss, Detektion bei 250 nm, 34 bar

Retentionszeiten: Benzaldehyd = 8,7 min; (*S*)-Benzoin = 19,7 min; (*R*)-Benzoin = 28,7 min

Zur Überprüfung der Stereoselektivität der BAL sowie der Varianten HisBAL Δ und BAL Δ His wurden 0,1 mg/ml Enzym mit 20 mM Benzaldehyd (50 mM TEA Puffer, pH 8 mit 2,5 mM MgSO₄, 0,5 mM ThDP, 30% DMSO) versetzt und für 1 h bei 25 °C inkubiert. Anschließend gründlich 1:2 (v/v) mit n-Hexan gemischt und 1 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Das in die n-Hexan Phase übergetretene Benzoin wurde anschließend, wie oben angegeben, auf seine Enantiomerenreinheit hin untersucht. Der Enantiomerenüberschuss (*enantiomeric excess, ee*) wurde über folgenden Zusammenhang berechnet:

$$ee = \frac{E_1 - E_2}{E_1 + E_2} \cdot 100\% \quad \text{Gleichung 1}$$

E_1 = Peakfläche des Enantiomers im Überschuss

E_2 = Peakfläche des Enantiomers im Unterschuss

3.9 Bestimmung der Enzymaktivitäten

Enzymaktivitäten (Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten) können auf verschiedene Weisen ermittelt werden. Zum einen gibt es kontinuierliche Tests, bei denen der Umsatz eines bestimmten Substrates entweder direkt oder über einen indirekten Nachweis *online* verfolgt wird. Bei kontinuierlichen Tests werden die Reaktionskomponenten gemischt und während der Reaktion z.B. die Produktbildung oder der Substratverbrauch direkt photometrisch ermittelt. Indirekt kann auch eine gekoppelte Reaktion, z.B. mit einem Hilfsenzym, photometrisch verfolgt werden. Bei diskontinuierlichen Aktivitätstests wird die Reaktion zu distinkten Zeitpunkten gestoppt und der Umsatz anschließend durch geeignete Methoden (z.B. HPLC-Analytik) ermittelt. In allen Aktivitätstests gilt, dass die Anfangsaktivität des Enzyms ermittelt werden soll. Also in den ersten Minuten der Reaktion, bei der die Reaktion das Gleichgewicht noch nicht erreicht hat oder eine Produktinhibierung zu beobachten ist. Die spezifische Aktivität der Enzyme wird in Units (U) angegeben:

Eine Unit entspricht der Enzymmenge, welche 1 μmol Substrat pro Minute bei den jeweiligen Bedingungen umsetzt.

3.9.1 Kontinuierliche Aktivitätstests

3.9.1.1 Gekoppelter photometrischer Test zur Bestimmung der Decarboxylaseaktivität (BFDH281A)

Reaktionspuffer pH 6,5:

50 mM Kpi
2,5 mM MgSO_4
0,1 mM ThDP

NADH-Lösung

2,5-3,5 mM NADH in Reaktionspuffer

Benzoylformiat-Lösung:

25 mM Benzoylformiat in Reaktionspuffer

HL-ADH-Lösung

1,25 U/ml HL-ADH in Reaktionspuffer

Die Decarboxylaseaktivität der BFDH281A wurde in einem gekoppelten photometrischen Test bestimmt. Das bevorzugte Substrat Benzoylformiat wird zu dem korrespondierenden Benzaldehyd unter CO_2 -Abspaltung durch die BFDH281A umgesetzt. Benzaldehyd wiederum

wird durch ein Hilfsenzym, die Alkoholdehydrogenase aus der Pferdeleber (HL-ADH) unter NADH-Verbrauch zu Benzalkohol reduziert. Da NADH ein Absorptionsmaximum bei 340 nm besitzt, während NAD^+ hier nicht absorbiert, kann zur Ermittlung der Aktivität die Abnahme des NADH photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt werden.

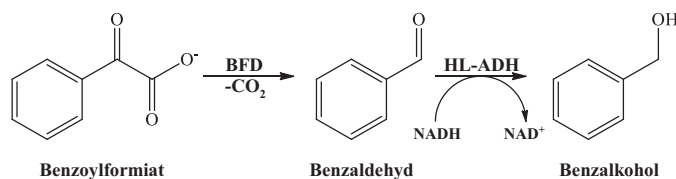


Abb. 17: Gekoppelter Decarboxylase Test. Die BFD sowie die *BFDH281A* spaltet 1 Benzoylformiat-Molekül zu CO_2 und Benzaldehyd. Der gebildete Benzaldehyd wird von der HL-ADH unter NADH-Verbrauch zu Benzalkohol reduziert.

Zu 700 μl Reaktionspuffer wurden 100 μl Substrat-, 100 μl NADH- und 50 μl ADH-Lösung in eine 1,5 ml Kunststoffküvette gegeben, mit einem Spatel gemischt und im Spektrophotometer ca. 5 min auf 30 °C erwärmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μl *BFDH281A*-Lösung gestartet und alle 10 Sek über einen Gesamtzeitraum von 90 Sek verfolgt. Die Messung ergibt eine Gerade mit fallender Steigung $-\Delta A/\text{min}$. Über folgenden Zusammenhang kann die volumetrische Aktivität berechnet werden:

$$\text{Aktivität}[\text{U/ml}] = \frac{\Delta A/\text{min} \cdot V}{\epsilon \cdot v \cdot d} \cdot f = \Delta A/\text{min} \cdot F \cdot f \quad \text{Gleichung 2}$$

$\Delta A/\text{min}$	Änderung der Absorption pro min
V	gesamtes Testvolumen (hier 1000 μl)
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient (für NADH 6,22 $\text{L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
v	Probenvolumen der Enzymlösung (hier 50 μl)
d	Schichtdicke der Küvette (1 cm)
f	Verdünnungsfaktor der Enzymlösung
F	Umrechnungsfaktor: 3,2154

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität in U/mg Enzym wurde die Proteinkonzentration ermittelt.

3.9.1.2 Gekoppelter photometrischer Test zur Bestimmung der Lyaseaktivität (BAL)

Reaktionspuffer pH 8:

50 mM Kpi
2,5 mM MgSO₄
0,1 mM ThDP

NADH-Lösung

3,5-7 mM NADH in Reaktionspuffer

HL-ADH-Lösung:

2,5-5 U/ml HL-ADH in Reaktionspuffer

Benzoin-Stammlösung:

31,8 mg Benzoin in PEG 400

Benzoin-Lösung 1,76 mM:

1,5 ml Benzoin-Stammlösung
7 ml Reaktionspuffer

Die Lyaseaktivität der BAL wurde unter anderem in einem gekoppelten photometrischen Test bestimmt. In diesem Test wird die Spaltung von einem Benzoin-Molekül zu zwei Benzaldehyd-Molekülen, welche die Alkoholdehydrogenase aus der Pferdeleber (HL-ADH) unter NADH-Verbrauch zu Benzalkohol reduziert, nachgewiesen. Die Messung der Aktivität erfolgte über die Messung der NADH-Abnahme bei 340 nm (Abb. 18).

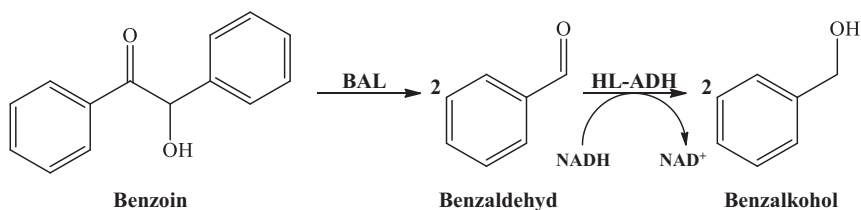


Abb. 18: Gekoppelter Benzoin-Lyase Test. 1 Benzoin-Molekül wird zu zwei Benzaldehyd-Molekülen durch die BAL gespalten. Der entstandene Benzaldehyd wird wiederum durch die HL-ADH unter NADH-Verbrauch zu Benzalkohol reduziert.

Zu 800 µl Benzoin-Lösung werden 100 µl NADH- und 50 µl HL-ADH Lösung direkt in eine 1,5 ml Kunststoff-Küvette gegeben und mit einem Spatel gemischt. In der Benzoin-Lösung war stets ein geringer Anteil Benzaldehyd enthalten, welcher durch autokatalytischen Zerfall des Benzoin entstanden ist. Dieser wurde sofort nach Zugabe der HL-ADH reduziert und hatte bereits einen hohen NADH-Verbrauch zur Folge. Der Ansatz wurde für 5-10 min bei 30 °C im Spektrophotometer inkubiert um eine möglichst vollständige Reduktion des Benzaldehyds zu gewährleisten. Die NADH-Konzentration wurde so hoch gewählt, dass nach dieser Zeit die Absorption bei 340 nm noch 2-2,2 betrug. Durch Zugabe von 50 µl BAL-Lösung wurde die Zielreaktion gestartet und alle 10 Sek die Absorption über einen Messzeitraum von 90 Sek verfolgt. Die volumetrische und spezifische Aktivität wurde wie in Kapitel 3.9.1.1

beschrieben ermittelt. Bei der Berechnung wurde berücksichtigt, dass ein Umsatz von zwei Mol NADH durch die HL-ADH einem Mol Benzoin Umsatz der BAL entspricht.

3.9.1.3 Etablierung eines direkten fluoreszenzphotometrischen Test zur Bestimmung der Ligaseaktivität (BAL)

Lumineszenz beschreibt die Emission von Licht und wird in Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterschieden (Abb. 19). Durch die Absorption von Licht findet eine Anregung eines Elektrons aus dem Grundzustand S_0 (Singulett- oder Schwingungslevel) in den angeregten Zustand S_1 oder S_2 statt. Da dieser Zustand energetisch sehr ungünstig ist, wird die aufgenommene Energie wieder abgegeben. Dies kann unter anderem durch die Emission von Licht geschehen. Fluoreszenz wird aber nur durch einen Rückfall der Energie vom niedrigsten Energieniveau des angeregten Zustands von S_1 auf S_0 hervorgerufen. Bei Anregung eines Fluorophors auf ein höheres Energieniveau bedarf es zunächst einer anderen Energieabgabe, der so genannten inneren Umwandlung (z.B. von S_2 auf S_1). Ein Rückfall der Energie durch die Fluoreszenzemission (S_1 zu S_0) führt aber in der Regel nicht vollständig zur Wiederherstellung des Grundzustands S_0 , so wird ein Teil der Energie in Form von Wärme frei. Diese strahlungsfreien Prozesse (innere Umwandlung und Thermalisierung) führen dazu, dass das emittierte Licht eine geringere Energie besitzt als das absorbierte Licht. Die Emission ist gegenüber der Anregung also in den längerwelligen Bereich verschoben („*Stokes Shift*“).

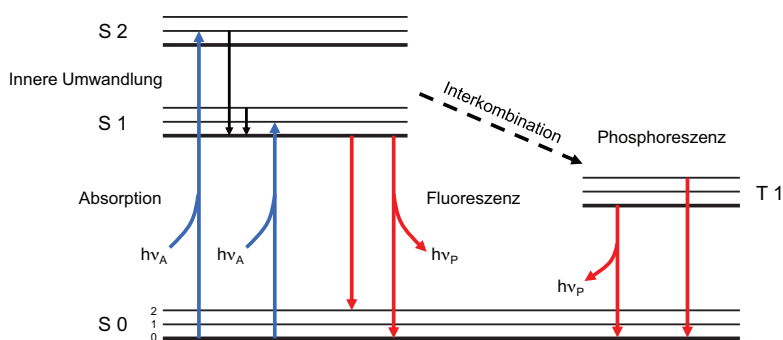


Abb. 19: Jablonski Diagramm (Lakowicz, 1999). Schematische Darstellung zur Entstehung von Luminiszenz. Die Singulett- oder Schwingungszustände S_0 , S_1 und S_2 sind in weitere unterschiedliche Energieniveaus eingeteilt (hier: 0, 1 und 2). Durch Absorption von Licht wird ein Elektron in einen höheren Schwingungszustand versetzt, durch den Prozess der inneren Umwandlung fällt das Elektron auf den Energielevel 0 von S_1 zurück. Von hier aus können durch Emission von Licht (Fluoreszenz) verschiedene Energieniveaus von S_0 erreicht werden. Durch zusätzliche strahlungsfreie Energieabgabe kann in jedem Fall der niedrigste Energielevel von S_0 erreicht werden. Im Falle einer Spinkkehr (Interkombination) kann ein Elektron auch den ersten Triplett-Zustand erreichen. Von hieraus findet eine langsame Energieabgabe durch Emission von Licht statt (Phosphoreszenz).

Mit Hilfe von Fluoreszenzphotometern kann eine Probe bei festgelegten Wellenlängen angeregt und die Emission ermittelt werden. In Abb. 20 ist der prinzipielle Aufbau eines Fluoreszenzphotometers dargestellt.

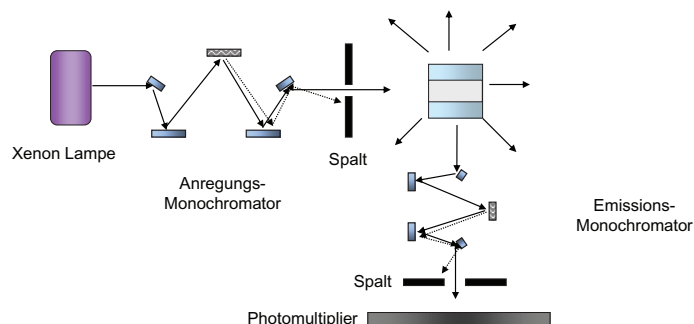


Abb. 20: Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzphotometers (nach Lakowicz, 1999). In vielen Fluoreszenzphotometern dient eine Xenon Lampe als Lichtquelle. Das Anregungslicht wird durch den Anregungsmonochromator geleitet und über ein Gitter (grau) die gewünschte Wellenlänge eingestellt. Durch den Spalt kann die Streuung des Lichtes kontrolliert werden. Bei kleinen Spaltbreiten ist die Anregungswellenlänge exakter, bei weit geöffnetem Spalt ist die Lichtmenge welche die Probe erreicht größer. Treffen die Photonen auf die Probe wird Licht in alle Richtungen emittiert. Normalerweise wird die Emission im 90° Winkel zum Anregungslicht gemessen. Da niemals nur Licht einer Wellenlänge emittiert wird, muss das Emissionslicht ebenfalls durch einen Monochromator geleitet werden, um die zu messende Wellenlänge herauszufiltern. Die Streuung des Lichtes wird ebenfalls über einen Spalt reguliert. Mittels eines Photomultipliers werden die emittierten Photonen aufgefangen und in ein elektrisches Signal umgewandelt.

Der fluoreszenzphotometrische Aktivitätstest basiert auf den von Zavrel und Schmidt (Zavrel *et al.*, 2008) an der RWTH-Aachen entwickelten Test zur Messung von Reaktionsverläufen der BAL zur Ligaseaktivität mit 3,5-Dimethoxybenzaldehyd (DMBA) zu 3,3',5,5'-Tetramethoxybenzoin (TMBZ). Bei diesem Test werden die fluoreszierenden Eigenschaften des Substrates DMBA genutzt, um den Substratverbrauch zu verfolgen (Abb. 21).

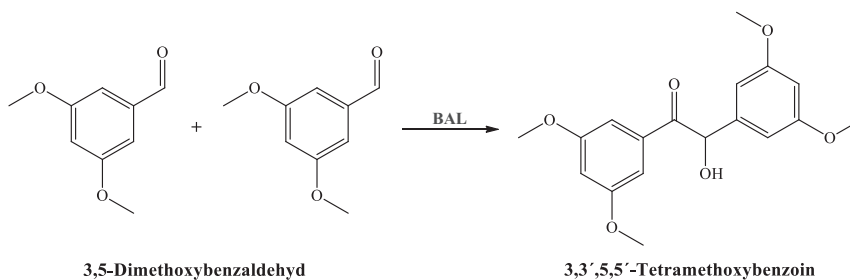


Abb. 21: DMBA-Ligasetest. Zwei Moleküle DMBA werden zu einem Molekül TMBZ verknüpft.

In dieser Arbeit sollte der Test nicht genutzt werden, um Reaktionsverläufe zu ermitteln, sondern Anfangsaktivitäten zu ermitteln. Hierfür war eine Anpassung des Testes notwendig. Des Weiteren ist die Fluoreszenz sehr komplex und kann von vielen Faktoren beeinflusst werden. So sind gerätespezifische Faktoren und die Küvettengeometrie von großer Bedeutung, Puffer und pH-Wert, sowie die Zugabe von Kosolventien können ebenfalls Einfluss auf die fluoreszierenden Eigenschaften einer Substanz haben. So genannte „*Quenching*–“ (Fluoreszenzlöschung) Prozesse können auftreten, welche z.B. durch den Zusammenstoß zweier Teilchen miteinander hervorgerufen werden. Die Wahrscheinlichkeit eines solchen dynamischen „*Quenchings*“ wird durch erhöhte Temperaturen, was gleichbedeutend mit einer höheren Teilchenbewegung ist, vergrößert. Aber auch eine hohe Teilchenzahl, z.B. des Fluorophors selbst, führt zu einer Erhöhung der Stoßzahl und damit zu einer Verringerung der Fluoreszenz. Des Weiteren ist besonders bei hohen Fluorophorkonzentrationen zu berücksichtigen, dass durch die Absorption des Anregungslichtes nur ein bestimmter Anteil an Molekülen, die dem Anregungslicht direkt ausgesetzt sind, angeregt wird. Dies kann ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf die Gesamtfluoreszenz haben.

Für die Etablierung des Aktivitätstests musste also eine große Zahl an Faktoren berücksichtigt werden. Der Test wurde zunächst am LS-50B von Perkin Elmer evaluiert (Kapitel 3.9.1.3.1), im Laufe dieser Arbeit stand das komplexere und sensitivere Fluoreszenzphotometer Fluorolog 3-22 von Horiba Jobin Yvon zur Verfügung und der Test wurde an dieses Gerät angepasst (Kapitel 3.9.1.3.2).

3.9.1.3.1 Etablierung des fluoreszenzphotometrischen Aktivitätstests am LS-50B

Reaktionspuffer pH 6,5 und pH 8:

50	mM	Kpi
2,5	mM	MgSO ₄
0,1	mM	ThDP

Substratlösung:

x	mM	DMBA in DMSO
---	----	--------------

Bei Zavrel *et al.* 2008 wird der Test in 50 mM Kpi-Puffer, pH 8,5 mit 30 vol% DMSO und 3 mM DMBA bei 25 °C durchgeführt. Die Fluoreszenz wird bei einer Wellenlänge von 360 nm angeregt und die Emission von DMBA bei 470 nm gemessen. Bis auf den pH-Wert wurden diese Parameter übernommen und die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der DMBA-Konzentration ermittelt. Hierfür wurden 700 µl Reaktionspuffer, pH 8 mit 300 µl Substratlösung (0,33-10 mM DMBA in DMSO) in einer Halbmikroküvette aus Quarzglas (SD: 10x4 mm) gemischt, auf 25 °C temperiert und die Fluoreszenz ermittelt (Abb. 22). Die

Küvette wurde, wie vom Techniker (Perkin Elmer) angegeben, mit der Schichtdicke von 10 mm im Anregungslicht positioniert. Die Fluoreszenz wird typischerweise in einem Winkel von 90° zum Anregungslicht gemessen, um eine Verfälschung des Messsignals durch den Anregungsstrahl zu vermeiden. Dies ist möglich, da Fluorophore in alle Richtungen emittieren (Abb. 20). Die Intensität der Fluoreszenz wird beim LS-50B in relativen Einheiten von 0-1000 angegeben, gemessen wurde mit der größt möglichen Spaltbreite von $\pm 12,5$ nm.

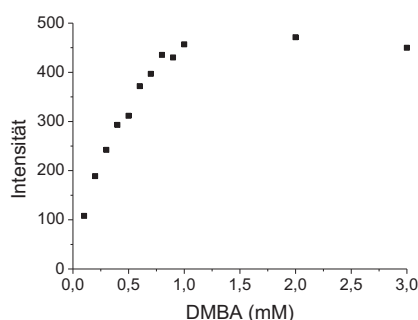


Abb. 22: Fluoreszenz von 0,1-3 mM DMBA. 50 mM Kpi-Puffer, pH 8, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP, 30% DMSO, Halbmikroküvette (SD: 10x4 mm), Anregung: 360 nm, Emission: 470 nm, Spaltbreiten: $\pm 12,5$ nm, T=25 °C.

Bis 1 mM DMBA ist eine Zunahme der Fluoreszenz zu beobachten, oberhalb von 1 mM stagniert das Fluoreszenzsignal jedoch. Unter den gewählten Bedingungen ist eine Messung der Aktivität bei DMBA-Konzentrationen oberhalb von 1 mM DMBA also nicht mehr möglich. Wie bereits erwähnt, können Kosolventien, wie DMSO oder der pH-Wert einen Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften eines Stoffes haben. Dies sollte für DMBA überprüft werden. Zum Vergleich wurden je 800 μ l Reaktionspuffer, pH 6,5 oder pH 8 mit 200 μ l Substratlösung (0,5-15 mM DMBA in DMSO) vermischt auf 25 °C temperiert und die Fluoreszenzintensität gemessen.

Wie in Abb. 23 gezeigt, ist die gemessene Fluoreszenzintensität in Gegenwart von 30 vol% DMSO höher als mit 20 vol% DMSO. In beiden Fällen ist oberhalb von 1 mM DMBA eine Sättigung der Fluoreszenz zu beobachten. Bei den weit auseinander liegenden pH-Werten (pH 6,5 und pH 8) kann aber kein entscheidender Unterschied in der Fluoreszenz festgestellt werden.

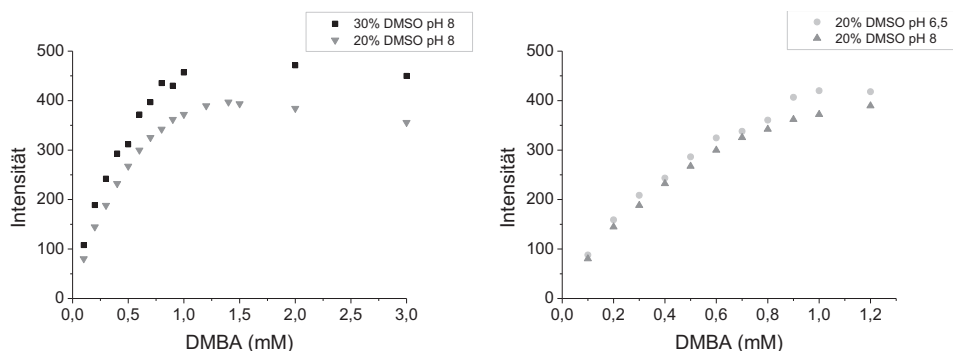


Abb. 23: Vergleich des Einfluss von DMSO (links) und des pH (rechts) auf die Fluoreszenz. 50 mM Kpi-Puffer, pH 6,5 oder pH 8; 2,5 mM MgSO_4 ; 0,1 mM ThDP, 20 vol% oder 30 vol% DMSO, Halbmikroküvette Quarzglas (SD: 10x4 mm), Anregung: 360 nm, Emission: 470 nm, Spaltbreiten: $\pm 12,5$ nm, $T=25$ °C.

Deshalb sollte nun der Einfluss von DMSO bis DMBA-Konzentrationen von 1 mM genauer untersucht werden. Da DMBA im Reaktionspuffer kaum löslich ist, wurde für die Messung ohne DMSO 2,5 mg DMBA in 20 μl DMSO gelöst und mit Reaktionspuffer auf 3 ml aufgefüllt ($<0,7$ vol% DMSO) und für 1 h gerührt. Diese 5 mM DMBA Lösung wurde für die Einstellung der Proben mit 0 vol% DMSO verwendet. Der tatsächliche DMSO Gehalt in den Proben erreicht also maximal 0,14 vol% bei 1 mM DMBA. Für Proben mit 10 vol% DMSO wurden 900 μl Reaktionspuffer mit 100 μl Substratlösung (1-10 mM), für 20 vol% DMSO 800 μl Reaktionspuffer mit 200 μl Substratlösung (0,5-5 mM), für 30 vol% DMSO 700 μl Reaktionspuffer mit 300 μl Substratlösung (0,33-3,33 mM) und für 40 vol% DMSO 600 μl Reaktionspuffer mit 400 μl Substratlösung (0,25-2,5 mM) gemischt. Die Lösungen wurden vor der Messung für ca. 5 min im Photometer auf 25 °C temperiert. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten sind in Abb. 24 gezeigt.

Das Fluoreszenzsignal ist zwar durch einen erhöhten DMSO Anteil intensiver, doch scheint der Bereich, bei dem die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der DMBA-Konzentration noch linear ansteigt (durch Geraden angedeutet), geringer zu werden. DMSO hat also nicht nur einen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität sondern auch auf die Linearität der Steigung. In allen Fällen ist erkennbar, dass die Fluoreszenz bei 1 mM DMBA langsam eine Sättigung erreicht. Bei Aktivitätstests ist aber eine möglichst hohe Substratkonzentration wünschenswert. Optimal wird die Aktivität bei Substratkonzentrationen ermittelt, bei denen das zu untersuchende Enzym die maximale Geschwindigkeit (V_{max}) erreicht. So werden die Messergebnisse nicht durch den Rückgang der Reaktionsrate, bei sinkender Substratkonzentration, verfälscht. Bei 2-3 mM DMBA ist dieser Substratbereich für die BAL erreicht,

unterhalb von 1 mM DMBA nimmt die Reaktionsrate der BAL allerdings rapide ab (Kocot, 2010). Deshalb wäre der Einsatz von DMBA-Konzentrationen oberhalb von 1 mM DMBA wünschenswert.

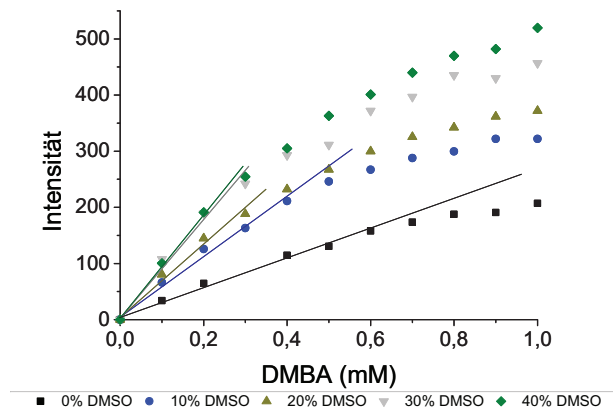


Abb. 24: Fluoreszenzintensität von DMBA bei verschiedenen DMSO-Konzentrationen. 50 mM Kpi-Puffer, pH 8; 2,5 mM MgSO₄; 0,1 mM ThDP; 0-40 vol% DMSO. Halbmikroküvette (SD=10x4 mm), Anregung: 360 nm, Emission: 470 nm, Spaltbreiten: $\pm 12,5$ nm, T=25 °C

Wie bereits erwähnt, kann auch die Küvettengeometrie einen Einfluss auf die Fluoreszenz besitzen. Also wurden zwei verschiedene Küvetten, Halbmikro- (SD: 10x4 mm) und Mikroküvette (SD: 10x2 mm) in verschiedenen Orientierungen zum Anregungslicht überprüft. Die Proben wurden so positioniert, dass sie mit der Schichtdicke (SD) von 10 mm im Anregungslicht orientiert waren, anschließend wurde die Position geändert, so dass sie mit der schmalere Schichtdicke von 4 mm bzw. 2 mm zum Anregungslicht orientiert waren (Abb. 25).

Die Schichtdicke, welche dem Anregungslicht zugewandt ist, wird im Folgenden immer zuerst genannt.

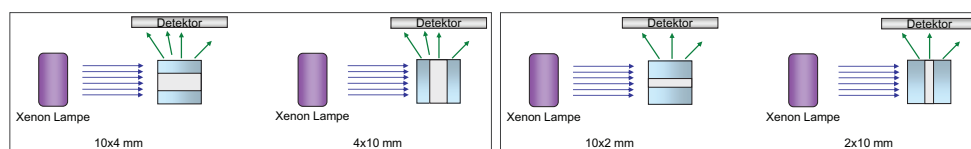


Abb. 25: Vereinfachte Darstellung der Küvettenorientierungen im Anregungslicht. Links: Eine Halbmikroküvette ist mit der Schichtdicke von 10 mm (10x4 mm) oder 4 mm (4x10 mm) im Anregungslicht positioniert. Rechts: Eine Mikroküvette ist mit der Schichtdicke von 10 mm (10x2 mm) oder 2 mm (2x10 mm) im Anregungslicht positioniert.

Zu je 1800 μl Reaktionspuffer pH 8 wurden 200 μl Substratlösung gegeben (1-40 mM). Je 1 ml der DMBA Lösungen wurde in einer Halbmikroküvette und 700 μl in einer Mikroküvette vermessen (Abb. 26).

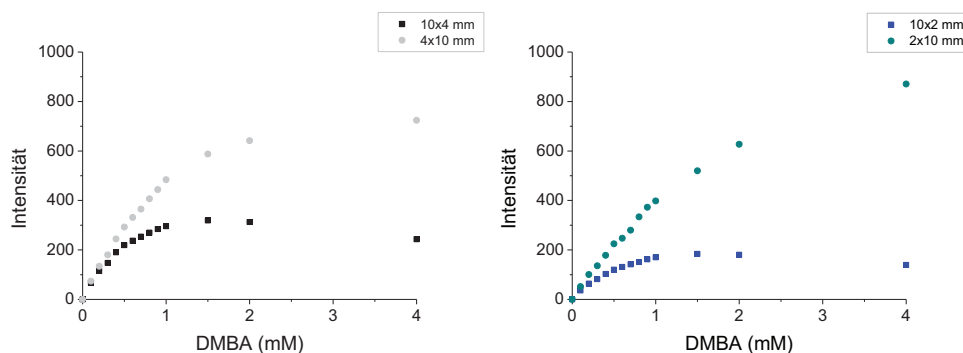


Abb. 26: Fluoreszenz von DMBA bei verschiedenen Küvettengeometrien. Links: Halbmikroküvette und rechts: Mikroküvette (die SD im Anregungslicht ist zuerst genannt). 50 mM Kpi-Puffer, pH 8; 2,5 mM MgSO_4 ; 0,1 mM ThDP; 10 vol% DMSO. Anregung: 360 nm, Emission: 470 nm, Spaltbreiten: $\pm 12,5$ nm, $T=25^\circ\text{C}$.

Bereits bei der Messung mit der Halbmikroküvette ist sofort erkennbar, dass die Orientierung der Küvette zum Anregungslicht einen entscheidenden Unterschied im Fluoreszenzsignal ausmacht. Bis etwa 0,3-0,4 mM DMBA ist das Fluoreszenzsignal fast identisch, aber oberhalb dieser Konzentration kann eine höhere Intensitätszunahme mit SD: 4x10 mm erreicht werden, auch oberhalb von 1 mM DMBA ist noch eine Intensitätszunahme zu beobachten. Messungen mit der Mikroküvette zeigen ein ähnliches Bild, mit SD: 10x2 mm ist das Fluoreszenzsignal relativ gering und eine Sättigung ist schnell erreicht. Durch die Positionierung der geringeren SD = 2 mm im Anregungslicht, kann eine entscheidend höhere Intensitätszunahme erreicht werden. Ein Vergleich der Messungen miteinander (Abb. 27) verdeutlicht den Einfluss der Schichtdicken auf die von der DMBA-Konzentration abhängige Steigung der Fluoreszenzintensität.

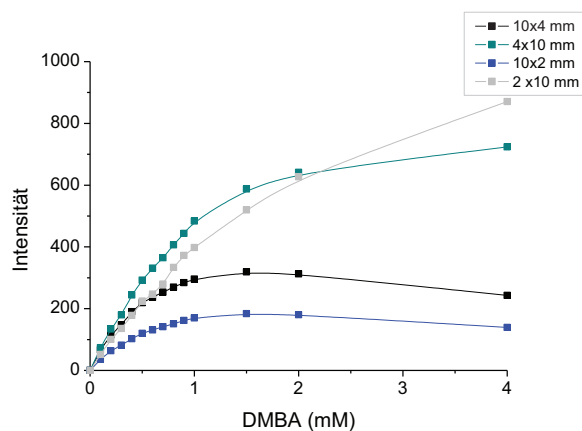


Abb. 27: Übersicht Fluoreszenz von DMBA bei verschiedenen Küvettengeometrien. 50 mM Kpi-Puffer, pH 8; 2,5 mM MgSO_4 ; 0,1 mM ThDP; 10 vol% DMSO. Halbmikroküvette und Mikroküvette (die SD im Anregungslicht ist zuerst genannt), Anregung: 360 nm, Emission: 470 nm, Spaltbreiten: $\pm 12,5$ nm, $T=25$ °C. Zur besseren Übersicht wurden die Messpunkte miteinander verbunden.

Mit SD: 10 mm in der Anregung ist das Fluoreszenzsignal mit der Halbmikroküvette intensiver als mit der Mikroküvette, dies ist vermutlich durch die unterschiedliche Molekülzahl im Strahlengang zu begründen. Ansonsten verlaufen die Kurven fast parallel zueinander. Trotz der geringeren Molmenge ist die Intensität in der Mikroküvette mit SD = 2x10 mm bis 0,6 mM DMBA identisch mit der Halbmikroküvette mit SD: 10x4 mm. Oberhalb dieser Konzentration ist das Fluoreszenzsignal mit der Mikroküvette sogar intensiver. Im Vergleich zur Messung mit der Halbmikroküvette mit SD: 4x10 mm ist die Intensität mit der Mikroküvette bei der SD = 2x10 mm bis 2 mM DMBA geringer, was wiederum durch die geringere absolute Molekülzahl im Strahlengang zu erklären ist. Allerdings ist die Steigung der Intensität oberhalb von 1 mM DMBA mit der Mikroküvette (2x10 mm) höher als mit der Halbmikroküvette (4x10 mm). Bei 2 mM DMBA ist die Fluoreszenz in beiden Küvetten vergleichbar, mit 4 mM ist das Fluoreszenzsignal mit der Mikroküvette sogar intensiver. Der positive Einfluss einer geringeren SD bei steigender DMBA-Konzentration im Anregungslicht lässt sich durch Absorptionsprozesse erklären.

Bei Erhöhung der Fluorophorkonzentration wird auch die optische Dichte erhöht, dies hat eine erhöhte Absorption des Lichtes zu Folge (Lambert-Beersches Gesetz). Je länger der Weg, den das Licht durch die Probe durchschreiten muss, desto geringer wird die Lichtintensität und damit auch die Anregung der Fluorophore (innerer Filtereffekt). Ist der Lichtweg kürzer, ist auch die Absorption geringer, also die Lichtintensität durchgängig höher und folglich ist die Fluoreszenzintensität höher (Abb. 28).

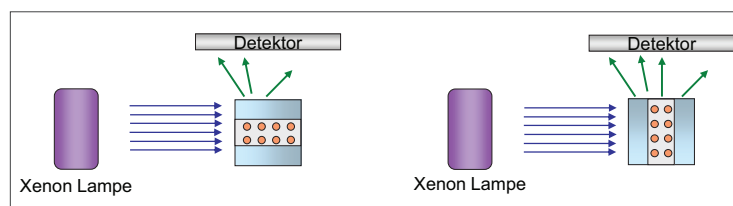


Abb. 28: Schematische Darstellung des Einflusses der Küvettenorientierung auf die Emission. Mit der größeren SD im Anregungslicht, wird ein Großteil der Photonen beim Durchtritt durch die höhere Moleküldzahl im durchstrahlten Probenvolumen bereits an der Probenoberfläche absorbiert und eine Anregung der Moleküle im inneren der Probe Bereich wird immer geringer. Die relative Quantenausbeute (emittierte Photonen/absorbierte Photonen) sinkt bei zunehmender Fluorophorkonzentration. Mit der geringeren SD im Anregungslicht, kann eine größere Photonenzahl die gesamte Probe erreichen, die relative Quantenausbeute ist somit größer.

Ein Vergleich des Absorptions- und Anregungsspektrums bei verschiedenen DMBA-Konzentrationen verdeutlicht den Einfluss des inneren Filtereffektes (Abb. 29).

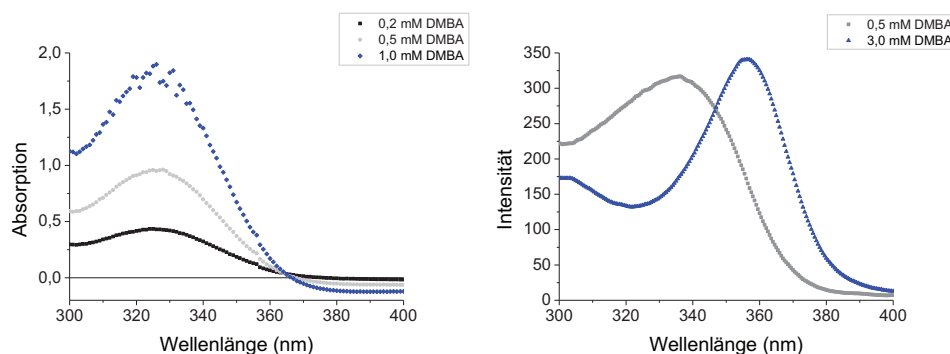


Abb. 29: Vergleich Absorptions- (links) und Anregungsspektrum (rechts) von DMBA. 50 mM Kpi-Puffer, pH 8; 2,5 mM MgSO_4 ; 0,1 mM ThDP; 20 vol% DMSO. Halbmikroküvette (SD: 4x10 mm), Anregung: 300-400 nm, Emission: 470 nm, Anregungsspalt: ± 5 nm, Emissionsspalt: $\pm 7,5$ nm $T=25^\circ\text{C}$

Das Absorptionsmaximum von DMBA liegt bei 327 nm, die optische Dichte (OD) beträgt hier bei 0,5 mM bereits 0,95. Die Absorption ist hier bereits so groß, dass kaum noch Licht mit der Wellenlänge von 327 nm durch die gesamte Probe treten kann. Mit 1 mM DMBA beträgt die $OD_{327\text{nm}}$ sogar 2, mit 3 mM DMBA liegt sie außerhalb des messbaren Bereichs. Da die Fluoreszenzintensität proportional zur Lichtintensität in der Probe abnimmt, wird das Fluoreszenzsignal in diesem Bereich mit steigender DMBA-Konzentration immer geringer. Aufgrund des inneren Filtereffektes verschiebt sich das Anregungsmaximum mit steigender DMBA-Konzentration in den längerwelligen Bereich. Mit 0,5 mM DMBA liegt das Anregungsmaximum bei 336 nm, mit 3 mM DMBA sogar bei 356 nm. Die Überlagerung von

Absorptions- und Anregungsspektren zeigt, dass die Absorption in diesen Bereichen wieder abnimmt (Abb. 30).

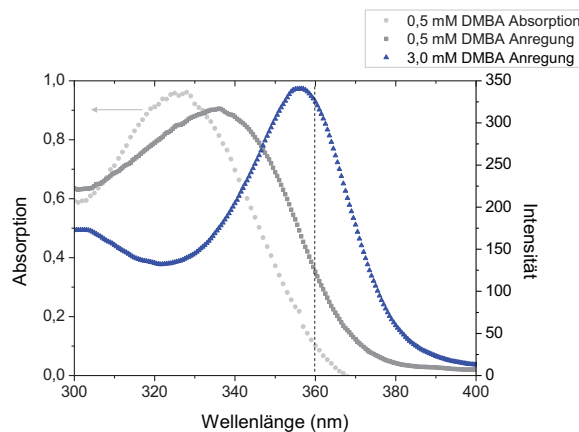


Abb. 30: Überlagerung Absorptions- und Anregungsspektrum. 50 mM Kpi-Puffer, pH 8; 2,5 mM MgSO_4 ; 0,1 mM ThDP, 20 vol% DMSO. Halbmikroküvette (SD: 4x10 mm), Anregung: 300-400 nm, Emission: 470 nm, Anregungsspalt: ± 5 nm, Emissionsspalt: $\pm 7,5$ nm $T=25^\circ\text{C}$

Die beobachteten Absorptionsprozesse legen nahe, dass die zu Beginn gewählten Spaltbreiten von $\pm 12,5$ nm nicht unbedingt optimal sind, um eine maximale Quantenausbeute zu erzielen. Ein Großteil des auf die Probe treffenden Lichtes, wird absorbiert und führt zu dem beschriebenen inneren Filter Effekt. Abb. 31 soll dies schematisch verdeutlichen.

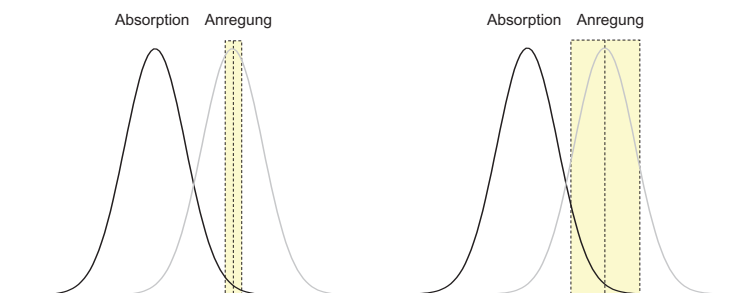


Abb. 31: Verwendung kleiner Spaltbreiten (links) und großer Spaltbreiten (rechts) im Anregungslicht. Bei kleinen Anregungsspaltbreiten, wird die Lichtmenge auf die Probe verringert. In diesem Bereich wird aber nur wenig Licht absorbiert. Bei größeren Spaltbreiten, wird die Lichtmenge auf die Probe vergrößert, ein Großteil des Lichtes wird aber schon früh absorbiert. Licht im längerwelligen Bereich führt nur zu einer geringen Anregung.

Im Folgenden sollte überprüft werden, welchen Einfluss die Spaltbreiten tatsächlich auf die Fluoreszenzintensität von DMBA haben. Hierfür wurden Anregungs- und Emissionsspektren von 0-3 mM DMBA mit 20 vol% DMSO bei verschiedenen Spaltbreiten vermessen.

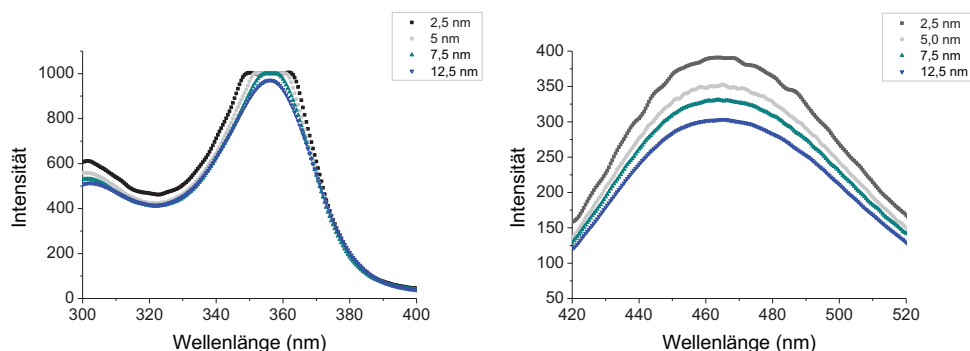


Abb. 32: Vergleich Anregungs- (links) und Emissionsspektrum (rechts) bei verschiedenen Anregungsspalten mit 3 mM DMBA. 50 mM Kpi-Puffer, pH 8; 2,5 mM MgSO₄; 0,1 mM ThDP; 20 vol% DMSO. Halbmikroküvette (SD: 4x10 mm), T=25 °C. Links: Anregung: 300-400 nm, Emission: 470 nm, Anregungsspalt: $\pm 2,5$ -12,5 nm, Emissionsspalt: $\pm 12,5$ nm. Rechts: Anregung: 360 nm, Emission: 420-520 nm, Anregungsspalt: $\pm 2,5$ -12,5 nm, Emissionsspalt: $\pm 7,5$ nm.

Aus Abb. 32 wird deutlich, dass die Variation des Anregungsspaltes zwar nicht zu einer Verschiebung des Anregungs- oder Emissionsspektrums führt, aber die Intensität der Fluoreszenz bei kleineren Anregungsspalten tatsächlich zunimmt. Bei einem Emissionsspalt von $\pm 12,5$ nm (Abb. 32, links) ist das Signal bereits bei einem Anregungsspalt von $\pm 7,5$ nm außerhalb des messbaren Bereiches. Um also bei kleineren Anregungsspaltbreiten messen zu können, muss auch der Emissionsspalt verringert werden (Abb. 32, rechts). Hier wird besonders deutlich, wie groß der Einfluss durch die Verringerung des Anregungsspaltes auf die Fluoreszenzintensität ist. Während das Maximum der Emission bei einem Anregungsspalt von $\pm 12,5$ nm bei etwa 300 liegt, kann mit einem Anregungsspalt von $\pm 2,5$ nm eine Intensität von etwa 390 gemessen werden.

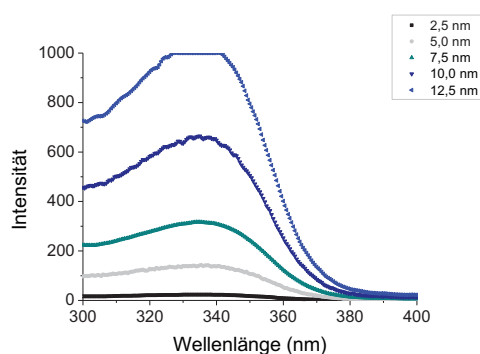


Abb. 33: Anregungsspektrum von DMBA bei verschiedenen Emissionsspalten mit 0,5 mM DMBA. 50 mM Kpi-Puffer, pH 8; 2,5 mM MgSO₄; 0,1 mM ThDP; 20 vol% DMSO. Halbmikroküvette (SD: 4x10 mm), Anregung: 300-400 nm, Emission: 470 nm, Anregungsspalt: $\pm 2,5$ nm, Emissionsspalt: $\pm 2,5$ -12,5 nm T=25 °C

In Abb. 33 ist das Anregungsspektrum abhängig von verschiedenen Emissionsspaltbreiten dargestellt. Hier zeigt sich, wie zu erwarten, dass die Fluoreszenzintensität bei größeren Spaltbreiten zunimmt, da natürlich mehr Licht auf den Photodetektor fällt. Ebenfalls war zu erwarten, dass der Emissionsspalt keinen Einfluss auf das Anregungsspektrum besitzt.

Ein Vergleich der Fluoreszenzintensität bei verschiedenen Anregungsspalten und DMBA-Konzentrationen zeigt, dass die Fluoreszenzintensität besonders bei hoch konzentrierten Proben (> 1 mM DMBA), mit sinkenden Spaltbreiten zunimmt. Eine entscheidende Verbesserung bezüglich der Steigung kann aber nicht beobachtet werden (Abb. 34). Die Verringerung des Anregungsspaltes hätte also kaum Auswirkungen auf den Aktivitätstest.

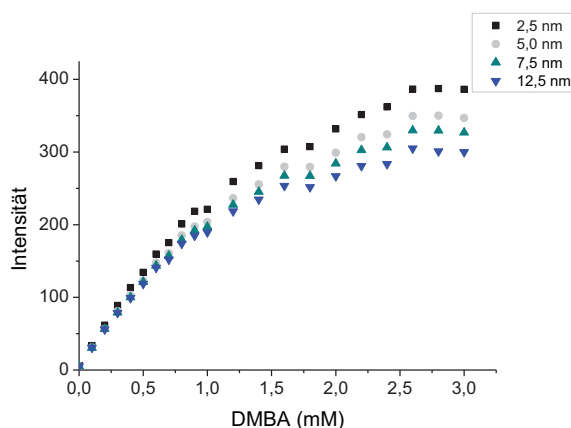


Abb. 34: Fluoreszenzintensität von 0-3 mM DMBA bei verschiedenen Anregungsspalten. 50 mM Kpi-Puffer, pH 8; 2,5 mM MgSO_4 ; 0,1 mM ThDP; 20 vol% DMSO. Halbmikroküvette (SD: 4x10 mm), Anregung: 360 nm, Emission: 470 nm, Anregungsspalt: $\pm 2,5$ -12,5 nm, Emissionsspalt: $\pm 7,5$ nm $T=25^\circ\text{C}$.

Aufgrund der beobachteten Ergebnisse wurde für den Aktivitätstest mit 10 vol% DMSO eine möglichst geringe DMSO-Konzentration gewählt. Aufgrund der geringen Löslichkeit von DMBA und besonders des Ligationsprodukts TMBZ kann nicht ganz auf DMSO verzichtet werden. Des Weiteren ist DMSO für die Ligationsreaktion ThDP-abhängiger Enzyme förderlich (Kapitel 1.5.1). Die Reaktion wurde in Halbmikroküvetten durchgeführt, wobei die Schichtdicke von 4 mm im Anregungslicht positioniert wurde, um den inneren Filtereffekt zu minimieren. Für die Messung bei DMBA-Konzentrationen oberhalb von 1 mM wäre zwar die Mikroküvette mit nur 2 mm Schichtdicke vorteilhafter, aber ein gründliches Mischen der Probe wäre mit handelsüblichen Rührspateln nicht möglich. Obwohl das Anregungsmaximum bei der gewählten Küvettengeometrie eigentlich bei 354 nm liegt, wurde 360 nm für die

Anregung gewählt, da die Differenz in der Fluoreszenzintensität hier größer ist (siehe Abb. 30). Die Emission wurde bei 470 nm gemessen. Für die Anregung wurde die Spaltbreite von ± 5 nm und für die Emission von $\pm 7,5$ nm gewählt. Nachdem die Bedingungen für den Fluoreszenztest festgelegt wurden, wurde eine Kalibrierung durchgeführt. DMBA-Konzentrationen von 0-2 mM wurden dreimal vermessen und eine Kalibrierkurve erstellt (Abb. 35).

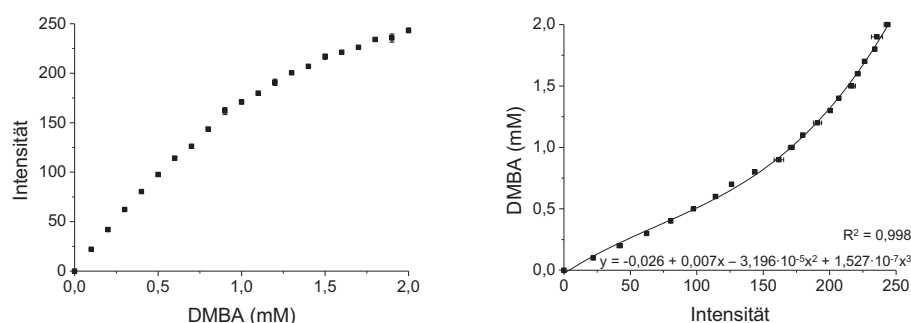


Abb. 35: Kalibrierung und Ermittlung einer Kalibrierkurve zur Quantifizierung der DMBA-Konzentration mit 0-2 mM DMBA. 50 mM Kpi-Puffer, pH 8; 2,5 mM MgSO₄; 0,1 mM ThDP; 10 vol% DMSO. Halbmikroküvette (SD: 4x10 mm), Anregung: 360 nm, Emission: 470 nm, Anregungsspalt: ± 5 nm, Emissionsspalt: $\pm 7,5$ nm T=25 °C. Links: gemessene Intensität abhängig von der DMBA-Konzentration, n = 3. Rechts: DMBA-Konzentration in Abhängigkeit von der gemessenen Intensität. Die Anpassung der Daten erfolgte polynomisch (kubisch).

Mit Hilfe der polynomischen Formel, konnte der Umsatz von DMBA durch die BAL über die Zeit ermittelt werden. Wobei eine Ausgangskonzentration von 1,2-1,5 mM DMBA für die Messung als sinnvoll erachtet wurde. Die genaue Durchführung, sowie Puffer und Lösungen, sind im Folgenden beschrieben.

Durchführung des Aktivitätstests am Perkin Elmer LS50-B:

Reaktionspuffer pH 8:

50 mM Kpi
2,5 mM MgSO₄
0,1 mM ThDP

Substratlösung:

15 mM DMBA in DMSO

Enzymlösung:

Lyophilisat oder Rohextrakt in Reaktionspuffer

Einstellungen:

Anregung:	360 nm	Emission:	470 nm
Anregungsspalt:	± 5 nm	Emissionsspalt:	$\pm 7,5$ nm
Messung:	1,5 min	Messpunkte:	0,1 min
Temperatur:	25 °C	Küvettengeometrie:	4x10 mm
Integration	0,1 sek		

Die Substratlösung wurde frisch zubereitet und mit Argon überschichtet, um eine Oxidation des DMBA weitestgehend zu vermeiden. Vor Beginn der Messung wurden 850 µl Reaktionspuffer mit 100 µl Substratlösung direkt in die Küvette gegeben, gründlich gemischt und für ca. 5 min im Photometer auf 25 °C temperiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 50 µl Enzymlösung gestartet. Hierbei sollte nur sehr vorsichtig mit einem Plastikspatel gerührt werden, da bei der Vermengung viele kleine Luftblasen entstehen können, welche zu Lichtstreuung führen und so das Resultat verfälschen. Die Enzymlösung wurde so eingestellt, dass die Abnahme der Fluoreszenzintensität innerhalb der 1,5 min Messzeit ca. 10-15 Einheiten entsprach, also einem Umsatz von etwa 0,1-0,2 mM DMBA. Die Abnahme der Fluoreszenz wurde über einen Zeitraum von 1,5 min verfolgt und anhand der zuvor erstellten Kalibrierkurve (Gleichung, Abb. 35) der Substratumsatz berechnet. Bei bekannter Enzymkonzentration konnte so die spezifische Aktivität in *Units* pro mg Enzym berechnet werden. Wobei 1 *Unit* als die Enzymmenge definiert ist, welche 1 µmol Substrat pro Minute umsetzt.

3.9.1.3.2 Anpassung des fluoreszenzphotometrischen Aktivitätstest am Fluorolog 3-22 (Horiba Jobin Yvon)

Reaktionspuffer pH 8:

50 mM TEA
2,5 mM MgSO₄
0,5 mM ThDP

Substratlösung:

0-20 mM DMBA in DMSO

Das Fluorolog 3-22 ist ein modular aufgebautes Fluoreszenzphotometer und besitzt gegenüber dem Tischgerät LS50-B einige Vorteile. Die Leistung der Lampe ist mit 450 Watt gegenüber 150 Watt (LS50-B) um ein Dreifaches höher, durch Doppelmonochromatoren in der Anregung wie Emission ist die Einstellung der Wellenlängenlängen spezifischer und die Spaltbreiten können wesentlich sensitiver eingestellt werden ($\pm 0,1$ nm bis $\pm 13,9$ nm). Zudem besitzt es eine „*Front Face*“ Option, d.h. die Emission kann nicht nur rechtwinklig (*Right Angle*, RA) zum Anregungslicht gemessen werden. Durch die Zuschaltung eines Spiegels wird bei der *Front Face* Messung das von der Oberfläche der Probe emittierte Licht zum Detektor weitergeleitet. Gemessen wird in einem Winkel von 22,5° relativ zum Anregungslicht um Störungen durch reflektiertem Licht oder Streulicht zu minimieren. Mit Hilfe dieser *Front Face* Einstellung können Reabsorptionsprozesse des emittierten Lichtes, z.B. von Feststoffen oder durch den inneren Filtereffekt, wie sie bei hoch konzentrierten DMBA-Konzentrationen beobachtet wurden (Kapitel 3.9.1.3.1) verringert werden. In Abb. 36

ist der Unterschied bei rechtwinkliger und *Front Face* Messung, stark absorbierender Proben schematisch dargestellt.

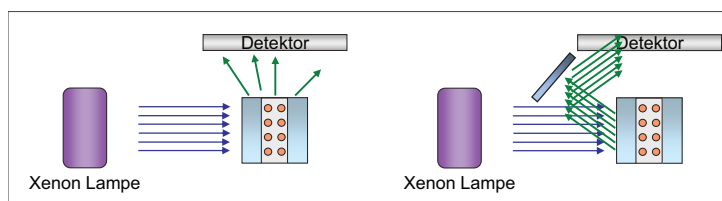


Abb. 36: Vereinfachte Darstellung der „Right Angle“ und der „Front Face“ Messung. Links: Die Emission wird im rechten Winkel zum Anregungslicht gemessen. Bei hoher Probenkonzentration, wird das Licht beim Durchtritt durch die Probe absorbiert und die Quantenausbeute ist relativ gering. Rechts: Die Emission wird im Winkel von 22,5° zum Anregungslicht gemessen, hier ist vor allem die Emission der direkt dem Anregungslicht zugewandten Fluorophore (bzw. an der Oberfläche der Probe) für die gemessene Fluoreszenzintensität von Bedeutung. Der Einfluss des inneren Filter Effektes ist somit geringer.

Beim Fluorolog 3-22 werden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten nicht in relativen Einheiten angegeben, wie beim LS50-B, sondern in gezählte Photonen pro Sekunde (*counts per second*, cps). Zur Ermittlung der Fluoreszenzintensität von DMBA am Fluorolog 3-22 wurden je 800 µl Reaktionspuffer mit 200 µl Substratlösung gemischt und für ca. 5 min im Photometer auf 25 °C temperiert.

Zuvor wurde gezeigt, dass mit 3 mM DMBA der innere Filtereffekt sehr stark ausgeprägt ist, so dass das Anregungsmaximum in einen Bereich verschoben ist, bei dem DMBA kaum noch absorbiert (Abb. 30). Des Weiteren ist der Intensitätsunterschied zu geringer konzentrierten Proben nur minimal (Abb. 30) bzw. nicht gegeben (Abb. 34). Beim Vergleich der Proben mit der SD von 10 mm im Anregungslicht, ist die absolute Intensität von 3 mM DMBA bei 360 nm mit der rechtwinkligen Messung höher als mit der *Front Face* Messung (Abb. 37). Dies ist auf die geringe Oberfläche der Probe bei der *Front Face* Messung zurückzuführen. Allerdings sind die Anregungsspektren verschoben: bei der rechtwinkligen Messung liegt das Maximum bei 361 nm, bei der *Front Face* Messung bei etwa 357 nm. Unterhalb von 350 nm ist die Anregung bei der *Front Face* Messung sogar höher als bei der rechtwinkligen Messung. Die Verschiebung des Anregungsspektrums, in einen Wellenlängenbereich bei dem DMBA eine höhere Absorption besitzt, zeigt, dass der innere Filtereffekt durch die *Front Face* Option verringert ist. Bei Betrachtung der Proben mit der SD von 4 mm im Anregungslicht (Abb. 37), ist die Fluoreszenzintensität mit der *Front Face* Option nicht geringer als bei der rechtwinkligen Messung. Dies ist durch die größere Probenoberfläche für die *Front Face* Messung begründet (vgl. Abb. 28 und Abb. 36). Die Intensität ist sogar um

mehr als das Doppelte erhöht. Außerdem ist hier eine weitere Verschiebung des Anregungsspektrums in Richtung des Absorptionsmaximums von DMBA zu beobachten. Bereits durch die veränderte Orientierung der Küvette im Anregungslicht findet eine Verschiebung des Anregungsmaximums auf etwa 354 nm statt. Durch Zuschalten der *Front Face* Option liegt das Anregungsmaximum bei etwa 349 nm. Diese Beobachtungen zeigen, welche Auswirkung die Wahl der Küvettegeometrie sowie der Geräteeinstellungen auf die Fluoreszenzmessungen haben.

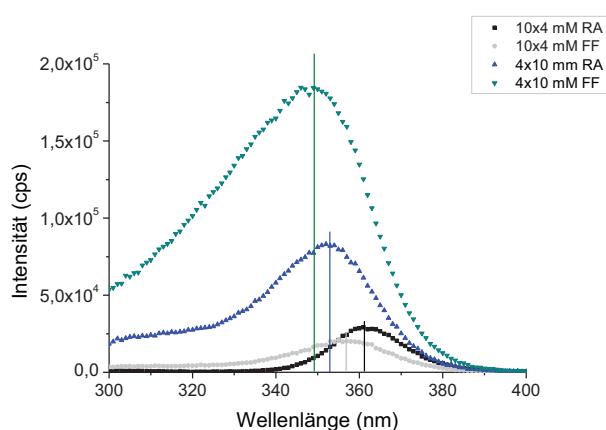


Abb. 37: Vergleich des Anregungsspektrums bei verschiedenen Küvettenorientierungen und der „*Front Face*“ (FF) Messung zur rechtwinkligen Messung (*Right Angle*, RA) mit 3 mM DMBA. 50 mM TEA-Puffer, pH 8; 2,5 mM MgSO₄; 0,5 mM ThDP; 20 vol% DMSO. Halbmikroküvette (SD: 10x4 mm sowie 4x10 mm), Anregung: 300-400 nm, Emission: 470 nm, Spaltbreiten: ± 1 nm, T=25 °C. Die Anregungsoptima sind durch Geraden markiert.

Wie die vorangegangenen Versuche bereits gezeigt haben, bedeutet eine höhere Fluoreszenz aber nicht automatisch eine Verbesserung in der Steigung der Intensität bei steigender DMBA-Konzentration. Ein Vergleich der Anregungsspektren bei verschiedenen DMBA-Konzentrationen mit der rechtwinkligen sowie der *Front Face* Messung und der SD von 4 mm im Anregungslicht zeigt aber eindeutig eine bessere Auftrennung der Signale (Abb. 38). Durch die *Front Face* Messung wurde nicht nur eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität und eine Verschiebung des Anregungsmaximums erreicht, sondern auch die Differenz in der Fluoreszenzintensität nimmt zu. Eine Anregung bei 360 nm hat bei *Front Face* Messungen keinen Sinn mehr, da die Differenz in der gemessenen Fluoreszenzintensität bei 350 nm wesentlich größer ist.

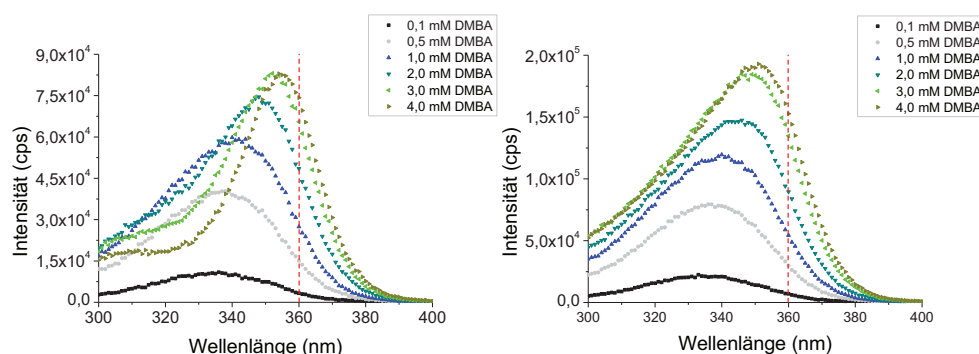


Abb. 38: Anregungsspektrum 0,1-4 mM DMBA mit „Right Angle“ (links) und „Front Face“ (rechts). 50 mM TEA-Puffer, pH 8; 2,5 mM MgSO_4 ; 0,5 mM ThDP; 20 vol% DMSO. Halbmikroküvette (SD: 4x10 mm), Anregung: 300-400 nm, Emission: 470 nm, Spaltbreiten: ± 1 nm, $T=25^\circ\text{C}$.

Abb. 39 verdeutlicht die Verbesserung für die Aktivitätsmessungen. Bereits ein Vergleich der rechtwinkligen Messungen mit der leistungsstärkeren Lampe im Fluorolog 3-22 gegenüber dem LS50-B zeigt, dass die Steigung der Fluoreszenzintensität länger linear verläuft. Wird nun auch noch die *Front Face* Option für die Messung genutzt, ist zum einen die Quantenausbeute erhöht, sowie eine erhöhte Steigung bis 3 mM DMBA erreicht. So ist mit dem Fluorolog 3-22 eine Messung der Aktivität mit 3 mM DMBA möglich, was im Substratsättigungsbereich der BAL liegt und somit V_{\max} -Messungen ermöglicht.

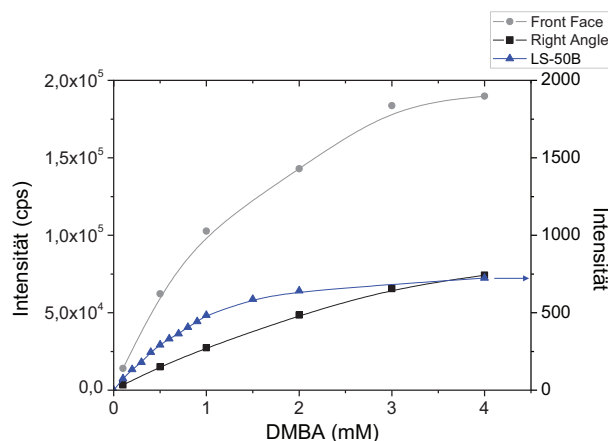


Abb. 39: Vergleich der Fluoreszenz bei 0-4 mM DMBA mit „Right Angle“, „Front Face“ gemessen am Fluorolog 3-22 und am LS-50B. Fluorolog 3-22: 50 mM TEA-Puffer, pH 8; 2,5 mM MgSO_4 ; 0,5 mM ThDP; 20 vol% DMSO. Halbmikroküvette (SD: 4x10 mm), Spaltbreiten: ± 1 nm, $T=25^\circ\text{C}$. „Right Angle“ Anregung: 360 nm, „Front Face“ Anregung: 350 nm, Emission: 470 nm. LS-50B: 50 mM Kpi-Puffer, pH 8; 2,5 mM MgSO_4 ; 0,1mM ThDP; 10 vol% DMSO. Halbmikroküvette (SD: 4x10 mm), Anregung: 360 nm, Emission: 470 nm, Spaltbreiten: $\pm 12,5$ nm, $T=25^\circ\text{C}$. Zur besseren Übersicht, wurden die Messpunkte miteinander verbunden.

Mit 4 mM DMBA wird eine Intensität von fast 200.000 cps erreicht, dies entspricht nur etwa 1/10 des maximalen Messbereichs des Geräts (2×10^6 cps), durch die Wahl größerer Spaltbreiten sollte das gemessene Signal erhöht werden. Spaltbreiten von $\pm 1,3$ -1,5 nm scheinen am besten geeignet für die Messung von DMBA zu sein (Abb. 40), hier liegt das Emissionsmaximum zwischen 8×10^5 und $1,5 \times 10^6$ cps. Bei Betrachtung des Emissionsspektrum fällt auf, dass das tatsächliche Emissionsmaximum eher bei 460 nm als bei 470 nm liegt, weshalb die Emission in den folgenden Messungen bei 460 nm detektiert wurde.

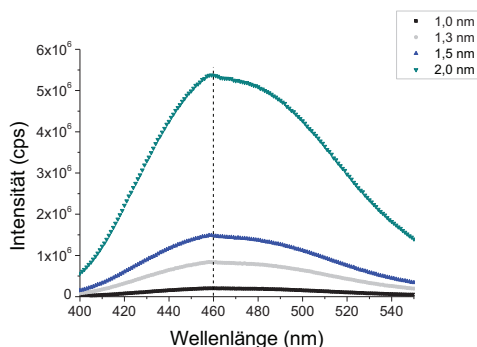


Abb. 40: Emissionsspektrum bei verschiedenen Spaltbreiten mit 4 mM DMBA. 50 mM TEA-Puffer, pH 8; 2,5 mM MgSO_4 ; 0,5 mM ThDP; 20 vol% DMSO. Halbmikroküvette (SD: 4×10 mm), Anregung: 350 nm, Emission: 400-550 nm, Spaltbreiten: ± 1 -2 nm, $T=25$ °C.

Nachdem die Bedingungen für den Fluoreszenztest am Fluorolog 3-22 festgelegt waren, wurde eine Kalibrierung durchgeführt. DMBA-Konzentrationen von 0-4 mM wurden dreimal vermessen und eine Kalibrierkurve erstellt (Abb. 35).

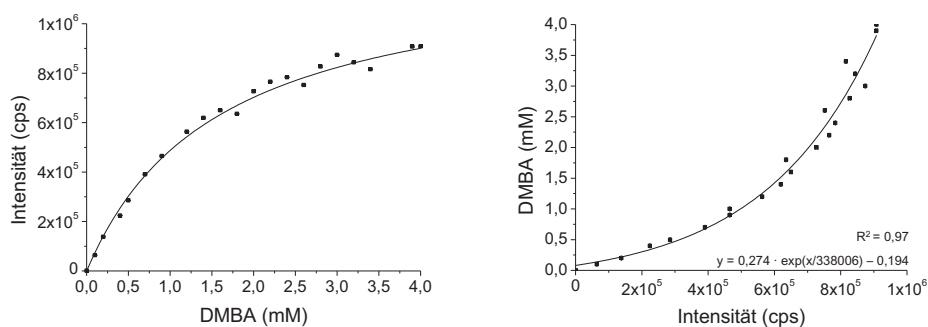


Abb. 41: Kalibrierung zur Quantifizierung der DMBA-Konzentration mit 0-4 mM DMBA. 50 mM TEA-Puffer, pH 8; 2,5 mM MgSO_4 ; 0,5 mM ThDP; 20 vol% DMSO, Halbmikroküvette (SD: 4×10 mm), „Front Face“, Anregung: 350 nm, Emission: 460 nm, Spaltbreiten: $\pm 1,3$ nm $T=25$ °C. Links: gemessene Intensität abhängig von der DMBA-Konzentration, $n = 3$. Rechts: DMBA-Konzentration in Abhängigkeit von der gemessenen Intensität. Die Anpassung der Daten erfolgte Exponential (1. Ordnung).

Mit Hilfe der exponentiellen Formel konnte der Umsatz von DMBA durch die BAL über die Zeit ermittelt werden. Wobei eine Ausgangskonzentration von 3 mM DMBA für die Messung als sinnvoll erachtet wurde. Die genaue Durchführung, sowie Puffer und Lösungen, werden im Folgenden beschrieben.

Durchführung am Fluorolog 3-22:

Reaktionspuffer pH 8:

50 mM TEA
2,5 mM MgSO₄
0,5 mM ThDP

Substratlösung:

15 mM DMBA in DMSO

Enzymlösung:

Lyophilisat oder Rohextrakt in Reaktionspuffer

Einstellungen:

Anregung:	350 nm	Emission:	460 nm
Anregungsspalt:	± 1,3 nm	Emissionsspalt:	± 1,3 nm
Messung:	90 sek	Messpunkte:	5 sek
Temperatur:	25 °C	Küvettengeometrie:	4x10 mm
Integration:	0,1 sek		

Die Substratlösung wurde frisch zubereitet und mit Argon überschichtet, um eine Oxidation des DMBA weitestgehend zu vermeiden. Vor Beginn der Messung wurden 750 µl Reaktionspuffer mit 200 µl Substratlösung direkt in die Küvette gegeben, gründlich gemischt und für ca. 5 min im Photometer auf 25 °C temperiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 50 µl Enzymlösung gestartet. Hierbei sollte nur sehr vorsichtig mit einem Plastikspatel gerührt werden, da bei der Vermengung viele kleine Luftblasen entstehen können, welche zu Lichtstreuung führen und so das Resultat verfälschen. Die Enzymlösung wurde so eingestellt, dass die Abnahme der Fluoreszenzintensität innerhalb der 1,5 min ca. 20.000-40.000 cps entsprach, also einem Umsatz von etwa 0,15-0,33 mM DMBA. Die Abnahme der Fluoreszenz wurde über einen Zeitraum von 1,5 min verfolgt und anhand der zuvor erstellten Kalibrierkurve (Gleichung, Abb. 41) der Substratumsatz berechnet. Bei bekannter Enzymkonzentration konnte so die spezifische Aktivität in *Units* pro mg Enzym berechnet werden. Wobei 1 *Unit* als die Enzymmenge definiert ist, welche 1 µmol Substrat pro Minute umsetzt.

Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsmessungen, werden normalerweise bis zu einem Substratumsatz von bis zu 10% verfolgt. So sollen Effekte, welche eine Minderung der Reaktionsrate, wie z.B. Verlangsamung der Reaktion durch Verringerung der Substratkonzentration,

Erreichen des Reaktionsgleichgewichtes oder Produktinhibierung zur Folge haben, ausgeschlossen werden. Messungen mit höheren BAL-Konzentrationen haben gezeigt, dass die Reaktion sogar bis zu einem Substratverbrauch von ca. 30% verfolgt werden kann, ohne dass eine signifikante Änderung in der Reaktionsrate zu beobachten ist (Abb. 42).

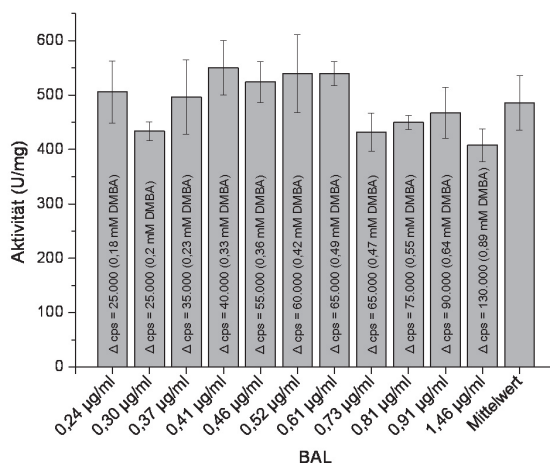


Abb. 42: Gemessene Aktivitäten in U/mg bei verschiedenen BAL-Konzentrationen. Die ungefähre Intensitätsabnahme innerhalb von 90 sek (Δ cps), sowie der mittlere Umsatz von DMBA in dieser Zeit sind angegeben. 50 mM TEA-Puffer, pH 8; 2,5 mM $MgSO_4$; 0,5 mM ThDP; 20 vol% DMSO. Halbmikroküvette (SD: 4x10 mm), „Front Face“, Anregung: 350 nm, Emission: 460 nm, Spaltbreiten: $\pm 1,3$ nm, T=25 °C, n = 3.

3.9.2 Diskontinuierliche Aktivitätstests (BAL)

Für die Ermittlung der Ligase- und Lyaseaktivitäten der BAL und ihrer Varianten wurden auch diskontinuierliche Aktivitätstests genutzt. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass der Umsatz nicht direkt verfolgt werden kann und so z.B. Enzymkonzentrationen nicht direkt angepasst werden können. Bei unbekannten Enzymkonzentrationen sind diese Tests also ungeeignet. Des Weiteren ist eine relativ große Probenzahl zu bewältigen, da für jeden Messzeitpunkt eine eigene Probe ausgewertet werden muss. Sind die Bedingungen, wie Enzymkonzentration, Messzeitraum, Probenverdünnung usw. aber erstmal ausgelotet, bieten diskontinuierliche Test mit der geeigneten Analytik den Vorteil, dass jede gewünschte Reaktion unter variablen Bedingungen vermessen werden kann.

3.9.2.1 Ermittlung der Ligaseaktivität abhängig von der 4-Chlorbenzaldehyd-konzentration

Reaktionspuffer pH 8:

50 mM TEA
2,5 mM MgSO₄
0,5 mM ThDP
30 % DMSO (v/v)

Substratlösungen:

0,5-25 mM 4-Chlorbenzaldehyd in Reaktionspuffer

Enzymlösung:

0,02 mg/ml BAL in Reaktionspuffer

Je 180 µl Substratlösung werden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen für 5 min bei 25 °C inkubiert, anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von 20 µl Enzymlösung gestartet. Nach exakt 2 min wird die Reaktion durch Zugabe und Mischen mit 200 µl Isopropanol (inklusive 0,7 vol% Perchlorsäure) gestoppt. Die Proben wurden unverdünnt oder 1:2 mit Isopropanol (inkl. 0,7 vol% Perchlorsäure) verdünnt mittels HPLC-Analytik (Kapitel 3.8.1) analysiert, die Bildung des 4,4'-Dichlorbenzoin bestimmt (Kapitel 3.8.1.1) und die spezifische Aktivität der BAL berechnet.

3.9.2.2 Ermittlung der Ligaseaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert

Reaktionspuffer pH 6-9:

50 mM TEA
2,5 mM MgSO₄
0,5 mM ThDP
30 % DMSO (v/v)

Substratlösungen pH 6-9:

50 mM Benzaldehyd (BA) in Reaktionspuffer
15 mM 4-Chlorbenzaldehyd (4CIBA) in Reaktionspuffer
10 mM 3,5-Dimethoxybenzaldehyd (DMBA) in Reaktionspuffer

Enzymlösung pH 6-9:

0,1 mg/ml BAL in Reaktionspuffer

290 µl bzw. für Benzaldehyd 295 µl Substratlösungen in den Puffern mit verschiedenen pH-Werten, wurden vorgelegt und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 10 µl bzw. 5 µl Enzymlösung gestartet (BA: 1,67 µg/ml; 4CIBA und DMBA 3,33 µg/ml). Nach 2 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 600 µl Isopropanol (inkl. 0,7 vol% Perchlorsäure) gestoppt, die Proben mittels HPLC-Analytik (Kapitel 3.8.1) analysiert und die Bildung des Produktes bestimmt (Kapitel 3.8.1.1). Die relativen Aktivitäten bei den verschiedenen pH-Werten wurden aus der Produktbildung nach 2 min berechnet.

3.9.2.3 Ermittlung der Lyaseaktivität abhängig von der 4,4'-Dichlorbenzoinkonzentration

Reaktionspuffer pH 8:

50	mM	TEA
2,5	mM	MgSO ₄
0,5	mM	ThDP
30	%	DMSO (v/v)

Substratlösungen:

0,08-0,91	mM	4,4'-Dichlorbenzoin in Reaktionspuffer
-----------	----	--

Enzymlösung:

0,02	mg/ml	BAL in Reaktionspuffer
------	-------	------------------------

Je 290 µl Substratlösung werden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen für 5 min bei 25 °C inkubiert, anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von 10 µl Enzymlösung gestartet. Nach exakt 1 min wurde die Reaktion durch Zugabe und Mischen mit 50 µl Isopropanol (inklusive 7 vol% Perchlorsäure) gestoppt. Die Proben wurden unverdünnt mittels HPLC-Analytik (Kapitel 3.8.1) analysiert, die Bildung des 4-Chlorbenzaldehyds bestimmt (Kapitel 3.8.1.1) und die spezifische Aktivität berechnet.

3.9.3 Bestimmung der kinetischen Parameter (V_{\max} und K_M)

Die Bestimmung der kinetischen Parameter V_{\max} und K_M erfolgte durch die Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen in einem diskontinuierlichen Aktivitätstest (Kapitel 3.9.2). Die Reaktionsgeschwindigkeit v wurde über eine Doppelbestimmung bei 25°C bestimmt. V_{\max} und K_M können durch eine einfache Michaelis-Menten-Kinetik bestimmt werden (Michaelis & Menten, 1913). Die Abhängigkeit der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$v = V_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad \text{Gleichung 3}$$

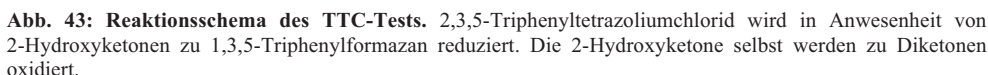
v	Anfangsreaktionsgeschwindigkeit [$\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]
V_{\max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit [$\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]
$[S]$	Substratkonzentration [mg ml^{-1}]
K_M	Michaelis-Menten-Konstante [mM]

Die Bestimmung von V_{\max} und K_M erfolgte, unter Verwendung der gemessenen spezifischen Aktivitäten, durch nicht linearer Regression mittels der Computersoftware Origin 8.

Reaktionspuffer pH 6,5-8: oder: **Reaktionspuffer pH 8:**

50	mM	TEA
2,5	mM	MgSO ₄
0,5	mM	ThDP

Substratlösung:
36 mM Aromatischer Aldehyd in Reaktionspuffer



81

basischen TTC-Lösung in jede Vertiefung der Mikrotiterplatten gegeben, wodurch die Enzymreaktion gestoppt und das entstandene 2-Hydroxyketon oxidiert wurde.

Entsprechend der Menge an entstandenem Produkt zeigt sich eine schwache bis intensive Rotfärbung. Die Platten wurden zur Dokumentation nach distinkten Zeitpunkten (max. 10 min) gescannt oder fotografiert. Der TTC-Test stellt eine Endpunktbestimmung dar, durch die eine Produktbildung nachgewiesen werden kann. Quantitative Aussagen sind nach einer vorangegangenen Kalibrierung möglich (Breuer *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wurde der TTC-Test nur für qualitative Analysen verwendet.

3.10 Bestimmung der Enzymstabilitäten

3.10.1 Stabilität gegenüber Rühreffekten

3.10.1.1 Bestimmung der Stabilität gegenüber magnetischem Rühren

Puffer pH 6,5-8:			Enzymlösung:	
50	mM	Kpi	0,5	mg/ml BAL oder BFDH281A in Puffer
2,5	mM	MgSO ₄		
0,1	mM	ThDP		

Für die Analyse einer hohen Probenzahl wurde ein Mehrfachmagnetrührer (Variomag Telesystem 60, Thermo Scientific, Deutschland) mit 60 gleichgeschalteten Stellplätzen gewählt. Laut Hersteller sollen die Abweichungen in der Rührgeschwindigkeit maximal 1% betragen, die maximale Drehzahl beträgt 1400 Upm. Dabei ist die Wärmeentwicklung des Gerätes sehr gering, so dass eine zusätzliche thermische Inaktivierung der Enzyme weitestgehend vernachlässigt werden konnte. Gerade bei Analysen in viskosen Flüssigkeiten bietet der gewählte Mehrfachmagnetrührer noch weitere Vorteile. Und zwar kann durch eine programmierbare Intervallschaltung der Rührvorgang kurzzeitig unterbrochen werden, so wird der Rührfisch in regelmäßigen Abständen neu zentriert und ein gleichmäßiges Mischen der Proben über lange Zeiträume gewährleistet. Zusätzlich kann die Beschleunigung bis zum Erreichen der Endgeschwindigkeit variiert werden, so dass ein unkontrolliertes Springen des Rührfisches durch zu schnelle Drehzahlerhöhung verhindert werden kann. Weiterhin ist das Gerät vollständig wasserdicht und kann direkt in ein Wasserbad zur Temperierung der Proben versenkt werden.

Analysen zur Stabilität der BAL oder BFDH281A gegenüber magnetischem Rühren wurden in 1,5 ml HPLC-Glasgefäßen mit Schraubdeckeln durchgeführt. Die Gefäße wurden nur

teilweise (0,5-0,6 ml) oder vollständig (1,9 ml) mit Enzymlösung gefüllt. Für jede entnommene Probe wurde ein eigener Ansatz gewählt. Die Proben wurden auf dem Mehrfachmagnetrührer Variomag Telesystem 60 (Thermo Scientific, Deutschland) bei 25 °C mit 1400 Upm und Intervallschaltung gerührt. Die Intervallschaltung wurde so eingestellt, dass alle 60 min eine Pause von 30 sek eingelegt wurde, damit der Rührfisch (zylindrisch, Mikro, 8 mm Länge Ø 1,5 mm, PFTE ummantelt) neu zentriert werden konnte. Die Aktivität wurde mittels Lyasetests (Kapitel 3.9.1.2) für die BAL und für die *BFDH281A* mittels Decarboxylasetest (Kapitel 3.9.1.1) relativ zu einer ungerührten Kontrolle ermittelt. Je Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Gleichzeitig wurde der lösliche Proteinanteil bestimmt. Aggregiertes und damit unlösliches Enzym wurde mittels Zentrifugation (5 min, 13.000 Upm) sedimentiert. Der im Überstand gelöste Proteinanteil wurde dann mittels Bradford ermittelt (Kapitel 3.5.2).

3.10.1.2 Bestimmung der Stabilität mittels Schaufelrührer

Puffer pH 6,5-8:

50 mM Kpi
2,5 mM MgSO₄
0,1 mM ThDP

Enzymlösung:

0,5 mg/ml BAL oder *BFDH281A* in Puffer

Der Schaufelrührer wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Antje Spieß (RWTH-Aachen) speziell als Über-Kopf-Rührer für kleine Volumina entwickelt. Das Steckmodul kann passgenau auf eine Makroküvette (3 ml) gesteckt werden und ist mit einem Motor verbunden. Über ein verstellbares Netzgerät, kann die Stromzufuhr und damit die Drehzahl reguliert werden (Abb. 44). Die entsprechende Drehzahl in Abhängigkeit von der gewählten Einstellung wurde mittels eines Lasertachometers bestimmt (Pohlmann, 2007).

2,5 ml der Enzymlösung wurde in eine Makroküvette aus Glas gegeben und bei 2400-6700 Upm für 24 h bei RT gerührt. Die Aktivität wurde mittels Lyasetests (Kapitel 3.9.1.2) für die BAL oder mittels Decarboxylasetests (Kapitel 3.9.1.1) für die *BFDH281A* relativ zu einer ungerührten Kontrolle ermittelt. Je Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Gleichzeitig wurde der lösliche Proteinanteil bestimmt. Denaturiertes und damit unlösliches Enzym wurde mittels Zentrifugation (5 min, 13.000 Upm) sedimentiert. Der im Überstand gelöste Proteinanteil wurde dann mittels Bradford ermittelt (Kapitel 3.5.2).

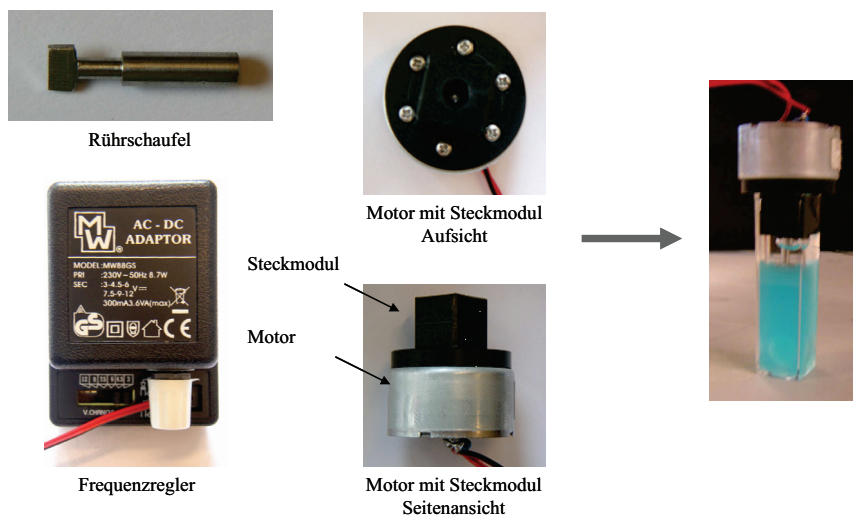


Abb. 44: Einzelkomponenten und Aufbau des Kopfrührers. (Abb. mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Ing. A. Spieß)

3.10.2 Bestimmung der Stabilität in 2-Phasen

Puffer pH 8:

50 mM Kpi
2,5 mM MgSO₄
0,1 mM ThDP

MIBK gesättigter Puffer:

10 ml Methylisobutylketon (MIBK)
100 ml Puffer
Mischen und trennen der Phasen im Scheidetrichter

Enzymlösungen:

0,5 mg/ml BAL in Puffer
0,5 mg/ml BAL in MIBK gesättigtem Puffer

Die Analysen zur Stabilität der BAL in 2-Phasen wurden in HPLC-Gefäßen aus Glas mit Schraubdeckel durchgeführt. Je Ansatz wurden 0,5 ml Enzymlösung in MIBK gesättigtem Puffer mit 0,5 ml MIBK gegeben. Für jede entnommene Probe wurde ein eigener Ansatz gewählt. Die Proben wurden auf dem Mehrfachmagnetrührer Telesystem 60 (Thermo Fischer, Deutschland) bei 25 °C mit 1400 Upm und Intervallschaltung gerührt. Die Intervallschaltung wurde so eingestellt, dass alle 60 min eine Pause von 30 sek eingelegt wurde, damit der Rührfisch (zylindrisch, Mikro, 8 mm Länge Ø 1,5 mm, PTFE ummantelt) neu zentriert werden konnte. Ungerührte 2-Phasen Proben, sowie 1 ml Kontrollen mit 0,5 mg/ml BAL in Puffer und MIBK gesättigtem Puffer (gerührt und ungerührt) wurden mitgeführt. Die Restaktivitäten wurden relativ zur Ausgangsaktivität mittels des fluoreszenzphotometrischen Aktivitätstest ermittelt (Kapitel 3.9.1.3). Je Probe wurde eine Dreifachbestimmung durch-

geführt. Aufgrund der Interaktion der Bradford-Lösung mit dem hydrophoben MIBK, war eine Quantifizierung des löslichen Proteinanteils nicht möglich.

3.10.3 Bestimmung der Stabilität gegenüber aromatischen Aldehyd Substraten

Reaktionspuffer pH 6,5-9:

50	mM	TEA
2,5	mM	MgSO ₄
0,5	mM	ThDP
30	%	DMSO

Enzymlösung:

1 mg/ml BAL in Reaktionspuffer

Aldehyd-Lösung:

Aromatischer Aldehyd in Reaktionspuffer

Der Einfluss einer Vielzahl aromatischer Aldehyde auf die Stabilität der BAL wurde untersucht. Für den Großteil der Untersuchungen wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit, wenn möglich, immer identisch vorgegangen (Tabelle 7). 2 mM des zu untersuchenden Benzaldehyds wurden in Reaktionspuffer vorgelegt, anschließend wurde die Enzymlösung zugegeben (Endkonzentration: 0,02 mg/ml) und vorsichtig gemischt. Der Inaktivierungsansatz wurde schnellstmöglich in 50 µl Aliquots in vorbereitete und bei 25 °C vorinkubierte 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben. Anschließend wurde für 1-2 h bei 25 °C und 1000 Upm im Thermoschüttler inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde die Restaktivität relativ zur Anfangsaktivität ermittelt, indem 200 µl einer frischen Substratlösung mit einer höheren Konzentration desselben Benzaldehyd (Tabelle 7) zugegeben und die Reaktion nach 2 min (linearer Bereich) durch Zugabe von Isopropanol (inkl. Perchlorsäure) wieder gestoppt wurde. Durch die Verwendung des selben Benzaldehyds für die Inaktivierung, wie für die Ermittlung der Aktivität konnte die Bildung von Kreuzprodukten und Mischeffekten vermieden werden. Für jeden Zeitpunkt wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Nach Sedimentation des Enzyms mittels Zentrifugation (1-5 min, 13.000 Upm) wurden die Proben mittels HPLC-Analytik vermessen und die Peakfläche des gebildeten Produktes ermittelt. Gleichzeitig wurde der Benzoin Anteil in der Inaktivierungsprobe ermittelt und bei der Bestimmung der Aktivität einbezogen.

Die Substratkonzentration in der Aldehydlösung zur Ermittlung der Anfangsaktivität wurde möglichst hoch gewählt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Konzentration unterhalb der Löslichkeitsgrenze lag. Die Löslichkeit von 3,5-Dibrombenzaldehyd lag unterhalb von 2 mM, deshalb konnte hier nur mit einer geringen Konzentration inaktiviert und die Aktivität ermittelt werden. Lag die Löslichkeit eines Substrates zwischen 2 mM und 10 mM wurde eine gesättigte Substratlösung für die Ermittlung der Aktivität verwendet, um eine höchstmögliche Substratkonzentration zu gewährleisten. In manchen Fällen, war die Aktivität der BAL zu

gering oder es war gar keine Aktivität nachweisbar, so dass die Enzymkonzentration erhöht werden musste.

Tabelle 7: Standardansätze zur Untersuchung der Enzyminaktivierung durch aromatische Aldehyde

Benzaldehyd	Konz. im Inaktivierungsansatz [mM]	Konz. der Aktivitäts-Lösung [mM]	Endkonz. im Aktivitätstest [mM]	Enzymkonz. im Inaktivierungsansatz [mg/ml]	Zugabe Isopropanol *(inkl. Perchlorsäure) [µl]
Benzaldehyd	2	50	40,4	0,02	500-1000
2-Methoxy	2	60	48,4	0,45	1000
3-Methoxy	2	40	32,4	0,02	1000
4-Methoxy	2	60	48,4	0,02	1000
3,5-Dimethoxy	2	10	8	0,02	1000
2-Fluor	2	22	18	0,02	250
3-Fluor	2	22	18	0,02	250
4-Fluor	2	22	18	0,02	500
3,5-Difluor	2	Gesättigt	n. b.	0,02	250
2,4-Difluor	2	22	18	0,02	400
2-Chlor	2	22	18	0,02	500
3-Chlor	2	22	18	0,02	200
4-Chlor	2	22	18	0,02	500
3,5-Dichlor	2	2,75	2,6	0,02	200
2-Brom	2	Gesättigt	n. b.	0,02	75
3-Brom	2	10	8,4	0,02	250
4-Brom	2	10	8,4	0,02	250
3,5-Dibrom	0,61	0,625	0,62	0,02	100
2-Tolyl	2	40	32,4	0,45	250
3-Tolyl	2	37	30	0,02	500
4-Tolyl	2	40	32,4	0,02	500
2-Nitro	2	10	8,4	0,45	300
3-Nitro	2	10	8,4	0,45	300
4-Nitro	2	10	8,4	2	300

n. b.: nicht bestimmt

* 0,7% Perchlorsäure (v/v) bei Volumina > 100 µl; 7% Perchlorsäure (v/v) bei Volumina ≤ 100 µl

Von den Standardansätzen abweichende Protein- oder Substratkonzentrationen sind hervorgehoben

Von den Standardbedingungen abweichende Ausnahmen sind grau hervorgehoben (Tabelle 7). Das Volumen der Isopropanol-Lösung wurde möglichst groß gewählt, musste aber aufgrund des Signals bei der HPLC-Analyse in vielen Fällen angepasst werden. Die Berechnung der Inaktivierungsrate erfolgte wie in Kapitel 3.10.4 beschrieben.

Inaktivierung in Abhängigkeit von der Substratkonzentration:

Für die Inaktivierungsansätze wurden Substratkonzentrationen zwischen 0,05 mM und 20 mM gewählt. Ansonsten wurden die Inaktivierungsanalysen wie oben beschrieben durchgeführt.

Inaktivierungsanalysen mit 4-CIBA in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration:

Für die Inaktivierungsansätze wurden Enzymkonzentrationen zwischen 0,004 mg/ml BAL und 2 mg/ml gewählt. Grundsätzlich ist der Versuchsaufbau wie oben beschrieben; die 4-Chlorbenzaldehydkonzentration betrug immer 2 mM. Für die Ermittlung der Restaktivität relativ zur Anfangsaktivität wurde zu distinkten Zeitpunkten 200 µl einer 22 mM 4-CIBA-Lösung zugegeben und die Reaktion nach 2 min wieder gestoppt. Aufgrund des sehr unterschiedlichen Umsatzes bei den verschiedenen Enzymkonzentrationen mussten die Inaktivierungsansätze aber zum Teil abweichend behandelt werden. Bei sehr geringen Enzymkonzentrationen wurde das Probenvolumen zur Ermittlung der Aktivität vergrößert, bei höheren Enzymkonzentrationen mussten die Proben vor Ermittlung der relativen Aktivität verdünnt werden. Wie die entsprechenden Proben abhängig von der Enzymkonzentration für die Ermittlung der relativen Aktivität eingesetzt wurden, ist in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Probenvolumina und Verdünnung der Inaktivierungsansätze

Enzymkonz. [mg/ml]	Inaktivierungsansatz [µl]	Verdünnung in Reaktionspuffer pH 8
0,004	200	-
0,008	100	-
0,04	25	-
0,08	12,5	-
0,2	50	1:10
0,5	50	1:25
2	50	1:100

3.10.4 Ermittlung der Desaktivierungskonstanten k_{des} und der Halbwertszeit

Durch die Enzyminaktivierung, nimmt die Konzentration an aktivem Enzym (E) kontinuierlich ab, durch die Desaktivierungskonstante k_{des} kann die Rate der Inaktivierung beschrieben werden:

$$\frac{dE}{dt} = -k_{\text{des}} \cdot E \quad \text{Gleichung 4}$$

Die Enzyminaktivierung kann durch Integration der Gleichung, als exponentielle Abnahme der Aktivität erster Ordnung in Abhängigkeit von der Zeit beschrieben werden:

$$A = A_0 \cdot e^{-k_{\text{des}} \cdot t} \quad \text{Gleichung 5}$$

Wobei A der Aktivität zum Zeitpunkt t und A_0 der Aktivität zum Zeitpunkt $t = 0$ entspricht. Die Desaktivierungskonstante selbst beschreibt eine relative Einheit in Abhängigkeit von der Zeit. Ein k_{des} von $0,05 \text{ min}^{-1}$ besagt also, dass die Inaktivierungsrate 5% pro Minute beträgt, unabhängig von der Bezugsgröße der ermittelten Aktivität (z.B. U/mg, relative Aktivität oder gebildetes Produkt nach 2 min). Anhand der ermittelten Desaktivierungskonstanten k_{des} , kann dann die Halbwertszeit ermittelt werden:

$$t = - \frac{\ln \frac{A}{A_0}}{k_{\text{des}}} \quad \text{Gleichung 6}$$

Die Halbwertszeit ($t_{1/2}$), ist der Zeitpunkt, bei dem die Aktivität der Hälfte der ursprünglichen Aktivität entspricht. Da die Aktivität $A_0 = 100\%$ und die Aktivität zum Zeitpunkt $t_{1/2}$ $A = 50\%$ ist und k_{des} ein relativer Wert ist, gilt:

$$t_{1/2} = - \frac{\ln 0,5}{k_{\text{des}}} \quad \text{oder:} \quad t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{\text{des}}} \quad \text{Gleichung 7}$$

Für die Ermittlung von k_{des} und $t_{1/2}$ wurden die ermittelten Aktivitäten (Kapitel 3.10.2 und 3.10.3) in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen und die Daten mit Hilfe der Gleichung 5 angepasst (Origin 8.0). Aus den so ermittelten k_{des} -Werten (min^{-1} oder h^{-1}), kann dann mit Gleichung 7 die Halbwertszeit berechnet werden. Eine einfache Umrechnung des prozentualen Anteils der Abweichung vom k_{des} zur Ermittlung der Standardabweichung für die Halbwertszeit ist nicht zulässig (persönliche Mitteilung von Dr. Erik von Lieres und Prof. Dr. Wolfgang Wiechert, IBT 2). Deshalb wurde bei nicht empirisch (aus unabhängigen Experimenten) ermittelten Inaktivierungsraten, die Halbwertszeit aus dem Mittelwert des ermittelten k_{des} , sowie der Summe und der Differenz aus k_{des} und der Abweichung gebildet. Die Standardabweichung wurde ebenfalls aus den so bestimmten Halbwertszeiten berechnet. Bsp: Eine Messung ergibt einen k_{des} von $0,001 \text{ min}^{-1}$ mit einer Abweichung von $\pm 0,0001$, die Inaktivierungsrate schwankt also im Bereich von $0,0009$ und $0,0011 \text{ min}^{-1}$. Mittels Gleichung 7 können drei $t_{1/2}$ eberechnet werden; 630 min, 693 min und 770 min. Der Mittelwert für die Halbwertszeit beträgt also 698 min mit einer Standardabweichung von ± 70 min.

3.10.5 Stabilität der BAL und der BAL-Deletionsvarianten in Puffer

Puffer pH 8 (ohne DMSO):

50 mM TEA
2,5 mM MgSO₄
0,1 mM ThDP

Enzymstocklösung:

4-6 mg/ml BAL, HisBALΔ, BALΔHis in Puffer ohne DMSO

Puffer pH 8 mit (DMSO):

70 % Puffer (v/v)
30 % DMSO (v/v)

Die hochkonzentrierte Enzymstocklösungen wurden auf 20 µg/ml in Puffer mit und ohne DMSO verdünnt, in 50 µl Aliquots aufgeteilt und bei 25 °C im Thermoschüttler (1000 Upm) inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde 200 µl Substratlösung zugegeben und die Reaktion nach 2 min (linearer Bereich) durch Zugabe von 500 µl Isopropanol (inkl. 0,7 vol% Perchlorsäure) wieder gestoppt. Für jeden Zeitpunkt wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Nach Sedimentation des Enzyms mittels Zentrifugation (1-5 min, 13.000 Upm) wurden die Proben mittels HPLC-Analytik (Kapitel 3.8.1) vermessen und die Konzentration des gebildeten 4,4'-Dichlorbenzoin (Kapitel 3.8.1.1) ermittelt.

3.11 Reaktivierungsanalysen

Reaktionspuffer pH 8:

50 mM TEA
2,5 mM MgSO₄
0,5 mM ThDP
30 % DMSO (v/v)

Enzymlösung:

BAL in Reaktionspuffer

Aldehyd-Lösung:

10-20 mM aromatischer Aldehyd in Reaktionspuffer

Elutionspuffer pH 8:

50 mM TEA
2,5 mM MgSO₄
0,5 mM ThDP

Für die Inaktivierung wurde jeweils ein Ansatz von 4 ml mit 0,5 mg/ml BAL gewählt um nach der Entsalzung eine ausreichend hohe Enzymkonzentration für die Aktivitätsmessungen zu gewährleisten. Die Aldehydkonzentration im Inaktivierungsansatz betrug 2 mM. Je 2 ml aus dem Ansatz wurden in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und 2-24 Stunden bei 25 °C (Thermoschüttler) inkubiert. Nach der Inkubation wurden 2-2,5 ml auf zuvor equilibrierte PD-10 Säulen (GE Healthcare, Schweden) gegeben und in frischem Puffer nach Herstellerangaben eluiert. Aufgrund der Porosität des Säulenmaterials müssen kleine Moleküle (Aldehyde) einen längeren Weg durch das Gelbett nehmen, während die großen Enzymmoleküle an den Sepharosepartikeln vorbei wandern. Dadurch ist ihre Durchtrittsgeschwindigkeit höher und die Enzyme treten zuerst durch die Säule. Freie Aldehyde können so von dem Enzym separiert werden. Die Enzymkonzentrationen wurden nach der Elution nach

Bradford ermittelt (Kapitel 3.5.2). Um Störungen der Bradford-Messung durch DMSO zu vermeiden, wurde dem Elutionspuffer kein DMSO zugesetzt. Parallel wurden 100 µl der Elution mit 100 µl Isopropanol inkl. 0,7 vol% Perchlorsäure versetzt, gründlich gevortext und nach Sedimentation des Enzyms (Zentrifugation: 1-5 min. 13.000 Upm) auf evt. Aldehyd- oder Benzoin-Rückstände mittels HPLC-Analytik (Kapitel 3.8.1) untersucht. Die relative Aktivität in den Inaktivierungsansätzen und eluierten Proben wurde wie in Kapitel 3.10.3 beschrieben ermittelt. Es wurden verschiedene Verdünnungen der Proben eingesetzt wurden (z.B. 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 und 1:20) um je nach Aktivität oberhalb der Nachweisgrenze zu messen. Die ermittelten Umsätze wurden mit einer Kontrolle ohne Zusatz von Aldehyden verglichen (0,5 mg/ml in Reaktionspuffer).

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Untersuchungen der verschiedenen Einflussfaktoren auf die Stabilität der BAL

Um einen Eindruck über die tatsächlichen Inaktivierungsprozesse der BAL im Emulsionssystem zu erhalten, sollen zunächst die Faktoren die destabilisierend oder deaktivierend auf die BAL wirken im Einzelnen analysiert werden. Im gerührten Emulsionssystem können diese vielfältig sein:

- Rühreffekte
- Interphaseneffekte
- pH-Wert
- Molekulare Toxizität des organischen Lösungsmittel
- Molekulare Toxizität der Substrate und Produkte
- Oxidation des Enzyms z.B. durch Luftsauerstoff
- Kinetische Inhibierung durch Substrate und Produkte

Die der BAL in der 3D Struktur sehr ähnliche Benzoylformiatdecarboxylase (BFD) aus *Pseudomonas putida* (Kapitel 1.4.4.1), wurde teilweise für vergleichende Analysen herangezogen. Aufgrund ihrer gegenüber dem Wildtyp Enzym erhöhten Benzoin syntheseaktivität wurde die Variante BFDH281A gewählt. Vergleichende Studien, in denen verschiedenste Parameter untersucht wurden, wiesen für die BFD sowie der Variante BFDH281A gegenüber der BAL stets erhöhte Stabilitäten, auch gegenüber den aldehydischen Substraten nach (Iding *et al.*, 2000, Kokova, 2009, Mikolajek *et al.*, 2007, Mikolajek *et al.*, 2009) (siehe auch Kapitel 1.4.4.3). Die gleichzeitig hohe strukturelle Ähnlichkeit und die dabei wesentlich höhere Stabilität der BFD macht diese für vergleichende Analysen mit der BAL sehr attraktiv.

4.1.1 Stabilität gegenüber Rühreffekten

Für die Analyse einer hohen Probenzahl wurde ein Mehrfachmagnetrührer (Variomag Telesystem 60, Thermo Scientific, Deutschland) mit 60 gleichgeschalteten Stellplätzen gewählt. Die Untersuchungen wurden in Probengefäßen aus Glas, mit einem Schraubver-

schluss und maximalem Füllvolumen von 1,9 ml auf dem in Abb. 45 gezeigten Mehrfachmagnetrührer durchgeführt (Kapitel 3.10.1.1).



Abb. 45: Versuchsaufbau zur Untersuchung der Rührstabilität mit dem Mehrfachmagnetrührer mit 60 Stellplätzen. Abb. ohne Thermobad.

Zunächst sollte der Effekt des Rührsystems auf die BAL und die BFDH281A ermittelt werden. Zum einen, um den Einfluss des Rührmodus auf die Enzymstabilität zu ermitteln und zum anderen, um die Eignung des gewählten Systems für weitere Analysen zu erproben. Falls es bereits durch den Magnetrührer zur Inaktivierung der Enzyme käme, wäre dieser Versuchsaufbau für weitere Analysen nicht geeignet.

Daher wurden die Einflüsse von starkem Rühren auf die Stabilität der Enzyme zuerst nur in wässrigem Puffer, mit einer minimierten und einer großen Wasser/Gas-Interphase untersucht. In einem gerührten System kann die Grenzfläche zwischen Gas (bzw. Luft) und Lösung ebenfalls einen negativen Effekt auf die Stabilität von Enzymen haben (Causette *et al.*, 1999, Colombie *et al.*, 2001). Als Kontrolle diente eine ungerührte Probe, die ohne Zugabe eines Rührfisches auf dem Magnetrührer platziert wurde (Abb. 46). Nach 24 h unter Rühren wurden die Aktivität sowie der Anteil des löslichen Proteins bestimmt, um die Inaktivierung anhand des Aktivitätsverlustes und der Proteinaggregation, die letztendlich zur Präzipitation führt, zu bestimmen (Kapitel 3.10.1.1). Vorversuche hatten gezeigt, dass beide Enzyme BAL und BFDH281A bei 25 °C (ohne Rühren) innerhalb von 24 h nur geringe Aktivitätsverluste zeigten (max. 10%), was bei den folgenden Versuchen kaum ins Gewicht fällt.

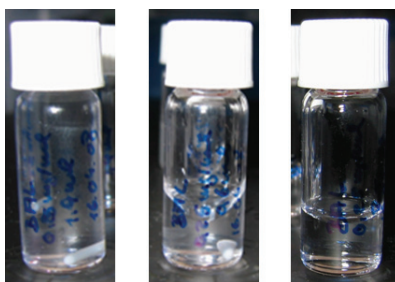


Abb. 46: Proben zur Bestimmung der Enzymstabilität gegenüber Rühreffekten. Links: Probe mit minimierter Luft/Gas-Interphase (1,9 ml Füllvolumen). Mitte: Probe mit großer Luft/Gas-Interphase (0,6 ml Füllvolumen). Rechts: ungerührte Kontrolle (0,6 ml Füllvolumen)

Um nicht im unteren Nachweisbereich des Aktivitätstest zu arbeiten und minimale Änderungen in der Aktivität messbar nachweisen zu können, wurde für die Versuche hohe Enzymkonzentrationen von 0,125 mg/ml bis 0,5 mg/ml gewählt. BAL und BFDH281A wiesen bei bisherigen Analysen im pH-Bereich von pH 6,5 bis pH 8 hohe Stabilitäten auf, allerdings liegt das Aktivitätsoptimum für die BAL zwischen pH 8 und pH 9,5 und für die BFD bei ca. pH 6-6,5 (Kapitel 1.4.4.3). Daher unterscheiden sich die üblicherweise verwendeten pH-Werte der beiden Enzyme bei der Katalyse. Für die Katalyse mit BFD werden Puffer mit pH 6,5 und für die Katalyse mit BAL werden Puffer zwischen pH 8 und pH 8,5 verwendet. Aufgrund der in anderen Studien am häufigsten unter Reaktionsbedingungen verwendeten pH-Werte, wurden für BAL pH 8 und für die BFDH281A pH 6,5 für die folgenden Analysen verwendet.

Wie aus Abb. 47 ersichtlich, wies die BAL nach 24 h Inkubation unter Rühren einen Aktivitätsverlust von ca. 5-30%, sowie eine Präzipitation von ca. 5-40% im Vergleich zur Kontrolle auf. Dabei korreliert der lösliche Proteinanteil mit der ermittelten Aktivität. Die Inaktivierung scheint daher eine Folge eines Aggregations- und anschließenden Präzipitationsprozesses zu sein. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Stabilitäten mit verschiedenen Enzymkonzentrationen ist nicht festzustellen. Allerdings ist auffällig, dass in den Proben mit einer vergrößerten Flüssig/Gas Interphase (0,6 ml Füllvolumen) die Inaktivierung und die Aggregation immer etwas stärker ausgeprägt ist (ca. 20-40%), als in den Proben mit minimierter Wasser/Gas-Interphase (ca. 10-20%).

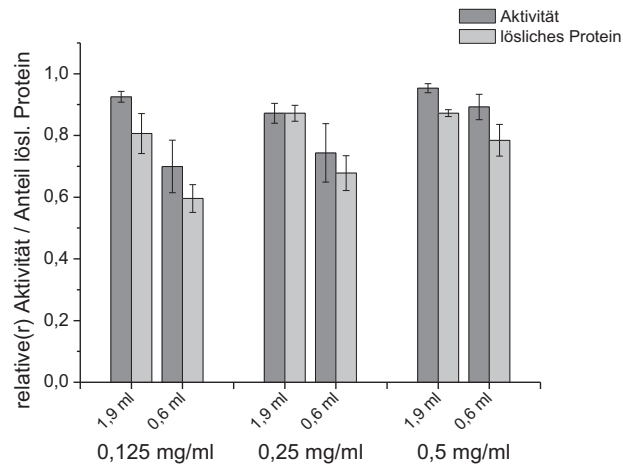


Abb. 47: Restaktivität und löslicher Proteinanteil der BAL nach 24 h Rühren. Vergleich bei zwei verschiedenen Volumina (1,9 und 0,6 ml) und je drei verschiedenen Enzymkonzentrationen. Die Aktivität und der Proteingehalt der Kontrollen nach 24 h wurden jeweils als 1 definiert. Magnetrührer 1400 Upm; 0,5 & 0,25 & 0,125 mg/ml BAL in 50 mM Kpi-Puffer, pH 8; 0,1 mM ThDP; 2,5 mM MgSO₄; T=25 °C; Probenzahl n=6.

Da auch Oxidationsprozesse an der Inaktivierung beteiligt sein könnten, wurde der nächste Versuch mit Argon-gesättigtem Puffer und Argon überschichteten Proben durchgeführt, womit eine eventuelle Oxidation durch Luftsauerstoff vermieden werden sollte.

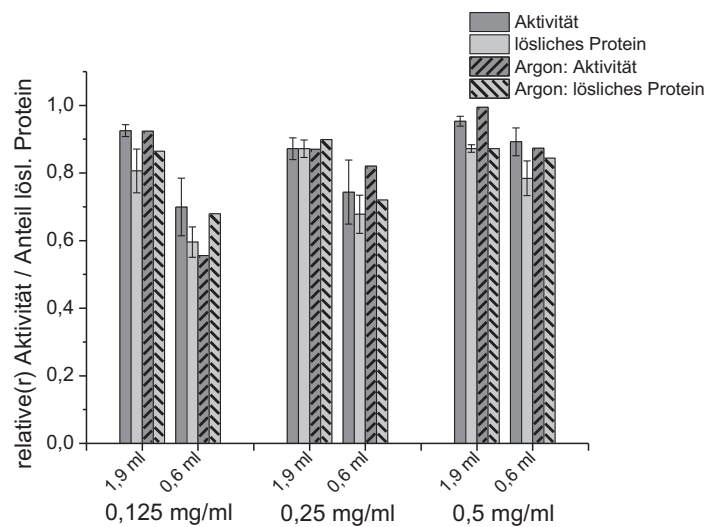


Abb. 48: Einfluss von Oxidationsprozessen auf die Stabilität der BAL nach 24 h Rühren. Vergleich bei zwei verschiedenen Volumina (1,9 und 0,6 ml) und je drei verschiedenen Enzymkonzentrationen. Die Aktivität und der Proteingehalt der Kontrollen nach 24 h wurden jeweils als 1 definiert. Magnetrührer 1400 Upm; 0,5 & 0,25 & 0,125 mg/ml BAL in 50 mM Kpi-Puffer, pH 8; 0,1 mM ThDP; 2,5 mM MgSO₄; T=25°C; Probenzahl: n=6 ohne Argon, n=1 mit Argon gesättigtem Puffer und Argon überschichteten Proben.

Wie aus Abb. 48 ersichtlich, sind die Werte mit und ohne Argon untereinander vergleichbar, eine Oxidation der Enzyme spielt hier also keine entscheidende Rolle. Möglicherweise hat die Flüssig/Gas-Interphase einen inaktivierenden Effekt auf die BAL. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Einfluss des Rührens durch das geringere Probenvolumen hervorgerufen wird.

Vergleichende Analysen mit der BFD Variante zeigten zunächst ein anderes Bild. Obwohl die *BFDH281A* bei vorangegangenen Arbeiten im Vergleich zur BAL stets höhere Halbwertszeiten zeigte und die Analysen in einem auf die Stabilität bezogenen üblicherweise optimalen pH durchgeführt wurden, nämlich pH 6,5 anstelle von pH 8, war schon nach wenigen Stunden eine weiße Trübung erkennbar. Nach spätestens 24 Stunden unter Rühren war die *BFDH281A* vollständig präzipitiert und somit inaktiv (Abb. 49).

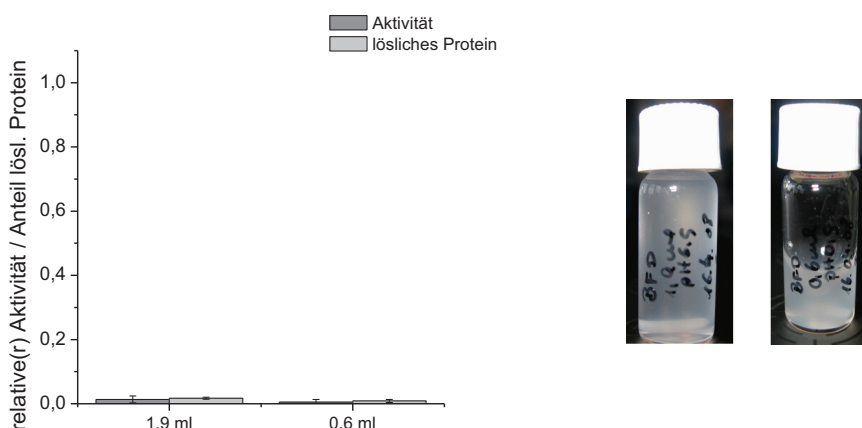


Abb. 49: Restaktivität und löslicher Proteinanteil der BFDH281A nach 24 h Rühren. Links: Die Aktivität und der Proteingehalt der ungerührten Kontrollen nach 24 h wurden jeweils als 1 definiert. Die Volumina der gerührten Proben betrugen 1,9 und 0,6 ml. Magnetrührer 1400 Upm; 0,5 mg/ml BFDH281A in 50 mM Kpi-Puffer, pH 6,5; 0,1 mM ThDP; 2,5 mM MgSO₄; T=25°C; n=3. Rechts: Präzipitation der BFDH281A nach 3 h unter Rühren.

Um auch hier Oxidationsprozesse auszuschließen, wurde derselbe Versuch mit Argon gesättigtem Puffer und Argon überschichteten Proben durchgeführt. Wie bereits bei der BAL beobachtet, konnte bei Verwendung des Inertgases keine erhöhte Enzymstabilität beobachtet werden. Allerdings befindet sich im Testsystem eine weitere hydrophobe Oberfläche, die bisher noch nicht diskutiert wurde, da sie im Falle der BAL keinen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität hatte. Hierbei handelt es sich um einen mit Teflon überschichteten Rührfisch, dessen hydrophobe Oberfläche möglicherweise zur partiellen Auffaltung und

anschließenden Aggregation des Proteins beitragen kann (Colombie *et al.*, 2001). Des Weiteren wird durch den Rührfisch eine Reibung am Boden des Gefäßes hervorgerufen. Um nun zu überprüfen ob die beobachtete Inaktivierung mit der *BFDH281A* durch den Rührfisch selbst oder die auftretenden Scherkräfte hervorgerufen wird, wurde ein alternatives Rührsystem verwendet: ein Kopfrührer, welcher in der Bioverfahrenstechnik der RWTH Aachen speziell für turbulentes Rühren in Küvetten entwickelt wurde. Um ein vollständiges Eintauchen der Rührschaufel in die Lösung zu gewährleisten, muss das Füllvolumen mindestens 2,5 ml betragen (Kapitel 3.10.1.2).

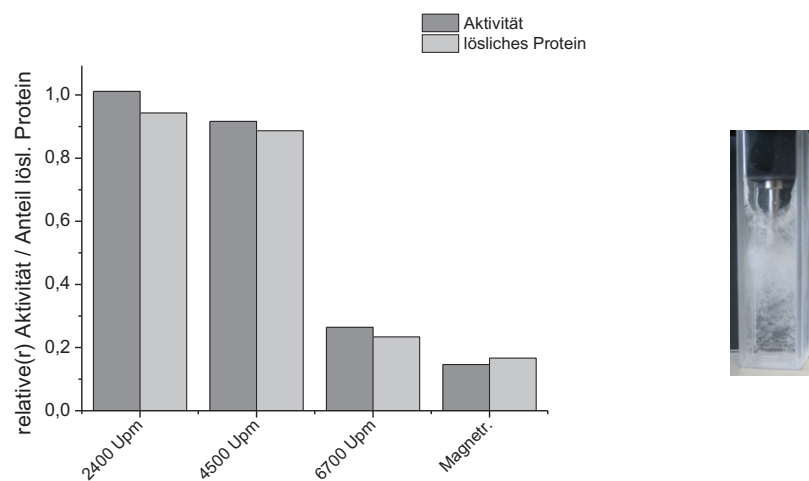


Abb. 50: Stabilität der *BFDH281A* unter Verwendung eines Kopfrührers. Links: Die Aktivität und der Proteingehalt der Kontrollen nach 24 h wurden jeweils als 1 definiert. Kopfrührer: die Rührfrequenz ist angegeben in Upm; Eine Kontrollprobe wurde auf dem Magnetrührer mit 1400 Upm durchgeführt; Makroküvette; 0,5 mg/ml *BFDH281A* in 2,5 ml 50 mM Kpi-Puffer, pH 6,5; 0,1 mM ThDP; 2,5 mM $MgSO_4$; n=1. Rechts: Turbulenz und Blasenbildung in der Küvette mit 2400 Upm.

Die Analysen mit Hilfe des Kopfrührers zeigten, dass trotz hoher Drehzahlen und hohen Turbulenzen in der Lösung, auch nach 24 Stunden keine nennenswerte Desaktivierung der *BFDH281A* stattgefunden hat. Erst bei sehr hohen Drehzahlen (6700 Upm) wurde eine erhebliche Inaktivierung (> 70%; Abb. 50) einhergehend mit Aggregation des Enzyms beobachtet. Zur Kontrolle wurde eine Probe auf dem Magnetrührer mitgeführt. Diese zeigte eine hohe aber keine vollständige Deaktivierung von über 80%. Ein ähnlicher Zusammenhang konnte auch für Rührversuche mit der BAL gefunden werden. Die Inaktivierung bei 6700 Upm betrug etwa 40-60%. Die Ursache der erhöhten Inaktivierung der BAL sowie der *BFDH281A* bei 6700 U/min mit dem Kopfrührer wurden nicht genauer untersucht. Die erhöhte Inaktivierungsrate von Enzymen und Proteinen, einhergehend mit Präzipitation,

wurde bereits verschiedentlich in der Literatur beschrieben (Fan *et al.*, 2001, Kuzmic *et al.*, 1996, Sears *et al.*, 1999, Toth *et al.*, 2009, Widjaja *et al.*, 2008). Eine höhere Drehzahl führt zu höheren Scherkräften, welche einen Einfluss auf die Stabilität von Proteinen haben können. Untersuchungen, die den Einfluss von Scherkräften, unter Ausschluss der Umgebungsluft, auf die Stabilität von Proteinen untersucht haben zeigen, dass die Inaktivierung von Proteinen durch Scherkräfte nur sehr gering und somit vernachlässigbar ist (Maa und Hsu, 1996, Maa und Hsu, 1997, Thomas und Dunnill, 1979, Thomas *et al.*, 1979). Vermutlich ist die Proteinaggregation bei höheren Drehzahlen hauptsächlich in der höheren Luftblasenzahl mit kleinerem Durchmesser und der damit einhergehenden Vergrößerung der Luft/Gas-Interphase begründet (Maa und Hsu, 1997, Thomas und Dunnill, 1979). Die beobachtete geringere Sensitivität gegenüber den Rührprozessen mit dem Kopfrührer stützt die Vermutung, dass die BFDH281A empfindlich auf die hydrophobe Oberfläche des Rührfisches reagiert, wogegen die BAL trotz des Magnetrührfisches über einen Zeitraum von 24 h eine hohe Stabilität aufweist.

4.1.2 Einfluss des pH-Wertes auf die Rührstabilität

Der einzige Unterschied in beiden magnetisch gerührten Versuchsaufbauten mit der BAL und der BFDH281A war der pH-Wert des Puffers. Daher wurden die Versuche für die BAL und die BFDH281A bei verschiedenen pH-Werten wiederholt.

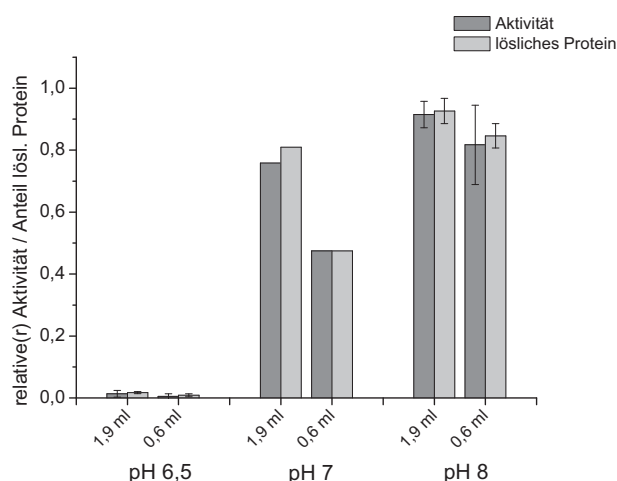


Abb. 51: Stabilität der BFDH281A nach 24 h magnetischem Rühren bei verschiedenen pH-Werten. Die Aktivität und der Proteingehalt der Kontrollen nach 24 h wurden jeweils als 1 definiert. Die Volumina der gerührten Proben betrugen je 1,9 und 0,6 ml. Magnetrührer 1400 Upm; 0,5 mg/ml BFDH281A in 50 mM Kpi-Puffer; 0,1 mM ThDP; 2,5 mM MgSO₄; T=25 °C. n=3 für pH 6,5 und pH 8; n=1 für pH 7.

Die nicht gerührten Kontrollen beider Enzyme zeigten innerhalb von 24 Stunden bei keinem der pH-Werte einen deutlichen Aktivitätsverlust (ohne Abb.).

Eine pH-Erhöhung um 0,5 Einheiten genügt bereits, um eine drastische Stabilisierung der *BFDH281A* gegenüber dem magnetischen Rühren zu erreichen (Abb. 51). Bei pH 8 ist die Stabilität vergleichbar mit den BAL-Experimenten. Umgekehrt zeigte die BAL bei Absenkung des pH-Werts eine geringere Stabilität gegenüber den Rühreffekten (Abb. 3.11). Indes ist die Inaktivierung sowie die Aggregation bei pH 6,5 nicht vollständig, sie beträgt nur ca. 40-60% nach 24 h.

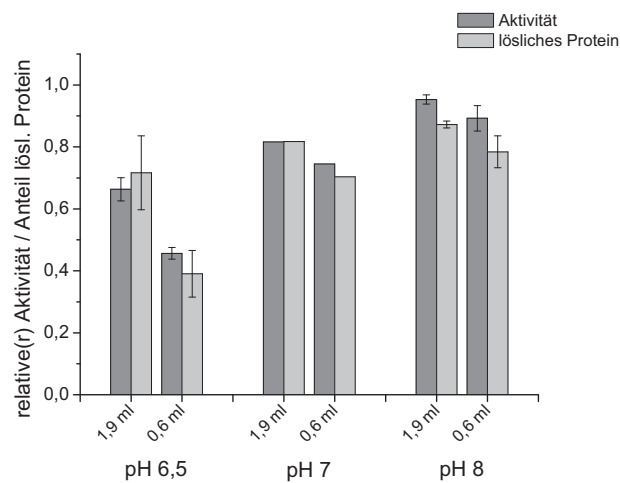


Abb. 52: Stabilität der BAL nach 24 h magnetischem Rühren bei verschiedenen pH-Werten. Die Aktivität und der Proteingehalt der Kontrollen nach 24 h wurden jeweils als 1 definiert. Die Volumina der gerührten Proben betrugen je 1,9 und 0,6 ml. Magnetrührer 1400 Upm; 0,5 mg/ml BAL in 50 mM Kpi-Puffer; 0,1 mM ThDP; 2,5 mM MgSO₄; T=25 °C; n=3 für pH 6,5; n=1 für pH 7; n=6 für pH 8.

Der Protonierungszustand beider Enzyme scheint also von großer Bedeutung für ihre Sensibilität gegenüber der hydrophoben Oberfläche des Rührfisches zu sein, wobei die BAL gegenüber diesem Effekt eine höhere Stabilität aufweist als die *BFDH281A*. Vermutlich findet eine Adsorption an der hydrophoben Oberfläche des Rührfisches und eine anschließende Auffaltung der *BFDH281A* statt. Dass Teflonoberflächen zu solchen Effekten führen können, wurde bereits für Lysozym beschrieben (Colombie *et al.*, 2001). Der Unterschied in der Inaktivierung der BAL und der *BFDH281A* ist vermutlich auf die verschiedenen isoelektrischen Punkte (pI) zurückzuführen. Ist der pH-Wert gleich dem pI eines Proteins liegen gleich viele Gruppen positiv sowie negativ geladen vor, die Gesamtladung ist gleich Null. Die Adsorption von Proteinen an Grenzflächen ist bei pH-Werten die an ihrem pI liegen am höchsten (Haynes und Norde, 1995, Kondo *et al.*, 1991, Norde, 1986). Es wird vermutet, dass die fehlende Gesamtladung zu einer Reduzierung elektrostatischer

Abstoßungseffekte zwischen Protein und Adsorptionsoberfläche führt. Für die BAL wurde ein pI von 4,6 mittels isoelektrischer Fokussierung ermittelt (Janzen *et al.*, 2006), während der pI für die BFD bei pH 6,5 liegt (Hasson *et al.*, 1995). Da bei der Variante BFDH281A nur eine Aminosäure ausgetauscht wurde ist keine nennenswerte Änderung im pI zu erwarten. Aufgrund der höheren Nettoladung der BAL bei pH 6,5 gegenüber der BFDH281A ist also eine geringere Adsorption an die Teflonoberfläche sehr wahrscheinlich. Die ungleiche Adsorptionsrate wiederum könnte zu den unterschiedlich ausgeprägten Inaktivierungseffekten führen. Bei pH 6,5 ist bei der BAL eine höhere Inaktivierung in der Probe mit dem kleineren Volumen (0,6 ml) zu beobachten als bei den anderen Proben. Dies könnte auf die erhöhte Zugänglichkeit des Enzyms für die Rührfischoberfläche zurückzuführen sein, so wirkt sich der destabilisierende Effekt verstärkt aus.

Eine SDS-PAGE-Analyse der BFDH281A weist auf einen weiteren Effekt durch den magnetischen Rührprozess hin. Eine 24 Stunden gerührte und vollständig inaktivierte Enzymprobe wurde vergleichend zu einer nicht gerührten Kontrolle elektrophoretisch aufgetrennt.

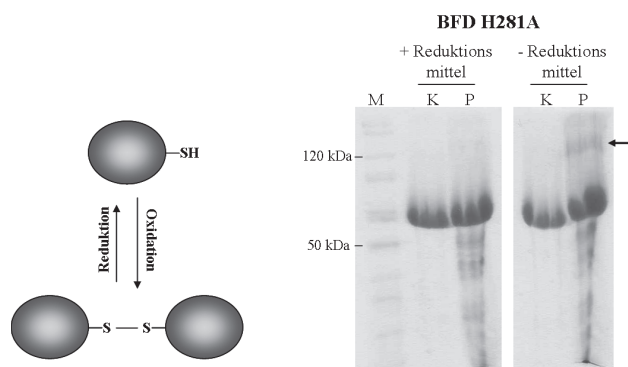


Abb. 53: Vergleichende SDS-PAGE Analyse der nativen BFDH281A (K) und einer vollständig inaktivierten Probe (P). Links: schematische Darstellung der intermolekularen kovalenten Verknüpfung von zwei Monomeren mittels Oxidation und die Spaltung der Disulfidbrücken durch ein Reduktionsmittel. Rechts: ca. 30-35 µg gereinigtes Enzym wurden nach 24 h Inkubation auf dem Magnetprüher gelelektrophoretisch auf einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant-Blau gefärbt. K: ungerührte Kontrolle; P: gerührte Probe; Magnetprüher 1400 Upm; 1 mg/ml BFDH281A in 50 mM Kpi-Puffer, pH 6,5; 0,1 mM ThDP; 2,5 mM MgSO₄. Reduktionsmittel: β-Mercaptoethanol (Inkubation ca. 7 min bei 98 °C), M: Marker (Page Ruler™ Unstained Protein Ladder, Fermentas).

Durch den denaturierenden Charakter von SDS werden Proteinaggregate, die nicht kovalent miteinander verknüpft sind, wieder voneinander getrennt, so dass einzelne Proteinketten nach Coomassie-Färbung als eine distinkte Bande zu erkennen sind. Die Oxidation von Proteinen kann über Cysteinreste zu intra- und intermolekulaten Disulfidbrücken führen. Diese

kovalenten Bindungen bleiben in Gegenwart von SDS stabil, werden allerdings durch Reduktionsmittel, wie β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol gespalten. Eine vergleichende Probenbehandlung des BFD-Präzipitats mit und ohne Reduktionsmittel ist in Abb. 53 gezeigt. Wie die Ergebnisse in Abb. 53 zeigen, ist ohne Zugabe von Reduktionsmitteln eine schmale Proteinbande bei einem Molekulargewicht von ca. 120 kDa erkennbar. Ein kleiner Anteil des Enzyms wird also oxidiert, dieser Anteil ist aber so gering, dass die Bildung intermolekularer Disulfidbrücken als Hauptdeaktivierungsgrund ausgeschlossen werden kann. Ein Großteil des Enzyms findet sich bei der nativen Monomerengröße von ca. 60 kDa wieder, was darauf hindeutet, dass der Hauptteil der Aggregation durch hydrophobe Wechselwirkungen hervorgerufen wird. Darüber hinaus ist ein weiterer Effekt auf die *BFDH281A* erkennbar: In der gerührten Probe sind auch Proteinfragmente mit kleineren Molekulargewichten zu erkennen (unterhalb von 60 kDa), anscheinend werden die Proteinaggregate durch die Reibung des Rührfisches am Boden zusätzlich zerkleinert (Abb. 53). Für die BAL konnte eine solche Fragmentierung, auch bei pH 6.5, nicht nachgewiesen werden. Vermutlich war die Inaktivierung durch den Rührprozess zu gering (ohne Abb.)

Fazit: Die Analysen haben gezeigt, dass der Rührmodus und der gewählte pH-Wert einen entscheidenden Einfluss auf die Enzymstabilität haben, wobei die BAL eine geringere Sensitivität gegenüber der hydrophoben Interaktion mit der Oberfläche des Magnetrührfisches zeigte als die *BFDH281A* (vgl. Abb. 51 und Abb. 52). Abgesehen von der Aggregation findet in den gerührten Proben auch eine Fragmentierung der aggregierten *BFDH281A* statt. Darüber hinaus konnte die Bildung von Aggregaten durch intermolekulare Disulfidbrücken als ein entscheidender Grund für die Deaktivierung ausgeschlossen werden. Die Wahl von größeren Probenvolumina kann den Deaktivierungsprozess durch den Magnetrührfisch verringern (Abb. 50 und Abb. 52). Diese Aspekte sind zwar sehr interessant, eine tiefer gehende Analyse war aber nicht Ziel dieser Arbeit. Die BAL weist eine ausreichende Stabilität gegenüber dem magnetischen Rühren auf, so dass eine Analyse der Stabilität auch mit organischen Lösungsmitteln im gewählten Versuchsaufbau möglich ist.

4.1.3 Einfluss einer Grenzfläche auf die Stabilität der BAL

Zur Untersuchung des Einflusses von Grenzflächen auf die BAL wurde Methylisobutylketon (MIBK) als organisches Lösungsmittel ausgewählt. Laut Schmidt und Zavrel eignet sich MIBK besonders gut für den Einsatz im Zweiphasensystem mit der BAL und eine

Lösungsmittelinhibierung sowie eine molekulare Toxizität konnte nicht festgestellt werden (Schmidt, 2008, Zavrel, 2009). Da der bisher verwendete gekoppelte Aktivitätstest (Kapitel 3.9.1.2) aufgrund der Produktionseinstellung des Hilfsenzym, der Pferdeleber Alkoholdehydrogenase (*HLADH*), nicht mehr verwendet werden konnte, wurde ein direkter fluoreszenzphotometrischer Aktivitätstest etabliert (Kapitel 3.9.1.3). Dieser basiert auf der fluoreszierenden Eigenschaften des aromatischen Substrates 3,5-Dimethoxybenzaldehyd, welches von der BAL zu 3,3',5,5'-Tetramethoxybenzoin umgesetzt wird. Die Aktivität der BAL wird durch den Umsatz des Substrates und der damit einhergehenden Abnahme der Fluoreszenzintensität über die Zeit ermittelt.

Durch die Probenentnahme mit MIBK als zweiter Phase, können Spuren des Lösungsmittels mit in den Ansatz für die Aktivitätsmessungen übertragen werden. Da die Fluoreszenz von jeglichen Komponenten im Messsystem beeinflusst werden kann, wurde zunächst überprüft ob durch den Übertrag eine Veränderung in der Fluoreszenz zu erwarten war. Es konnte kein Unterschied in der Fluoreszenz ermittelt werden (ohne Abb.), so dass die Analysen ohne eine weitere Kalibrierung durchgeführt werden konnten.

Die Stabilität der BAL wurde, wie in Kapitel 3.10.2 beschrieben ermittelt. Dabei wurde für jeden Zeitpunkt ein eigener Ansatz vermessen. Die Stabilität der BAL im Emulsionssystem sollte mit nicht gerührten sowie gerührten Kontrollen reiner Pufferlösung, MIBK gesättigtem Puffer (ca. 5 vol% MIBK) und MIBK als zweiter Phase verglichen werden. Je 0,5 mg/ml BAL wurden dazu in Phosphatpuffer oder MIBK-gesättigtem Puffer gelöst. Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit wurde jeweils vor der Inkubation bestimmt.

Die Messschwankungen für die Pufferkontrollen (Abb. 54 A) sind relativ hoch, in den anderen Proben jedoch akzeptabel. Innerhalb von 170 Stunden ist bei der ungerührten Pufferkontrolle eine Inaktivierung von etwa 30% festzustellen, während die Inaktivierung der gerührten Pufferkontrolle in diesem Zeitraum etwa 80% beträgt. Die Inaktivierung der BAL mit gesättigtem MIBK Puffer (Abb. 54 B) ohne Einfluss des Rührens liegt mit einer Inaktivierung zwischen 20-30% in einem ähnlichen Rahmen. Gegenüber der gerührten Pufferkontrolle, ist die Inaktivierung mit MIBK gesättigtem Puffer unter Rühren mit 60% etwas geringer. Dies mag auf eine Stabilisierung der BAL durch MIBK als Kosolvents hinweisen, sollte aber ohne eine Verifizierung der Experimente nicht überbewertet werden. Mit MIBK als zweiter Phase (Abb. 54 C) ist eine wesentlich schnellere Inaktivierung zu

beobachten. Bereits mit einer Interphase, also ohne eine Durchmischung der Phasen und den Einfluss von Rühreffekten, beträgt die Inaktivierung innerhalb von 170 Stunden schon 70%. Bei einer Durchmischung der Phasen und der damit einhergehenden Vergrößerung der wässrig-organischen Grenzfläche, beträgt die Inaktivierung etwa 90%.

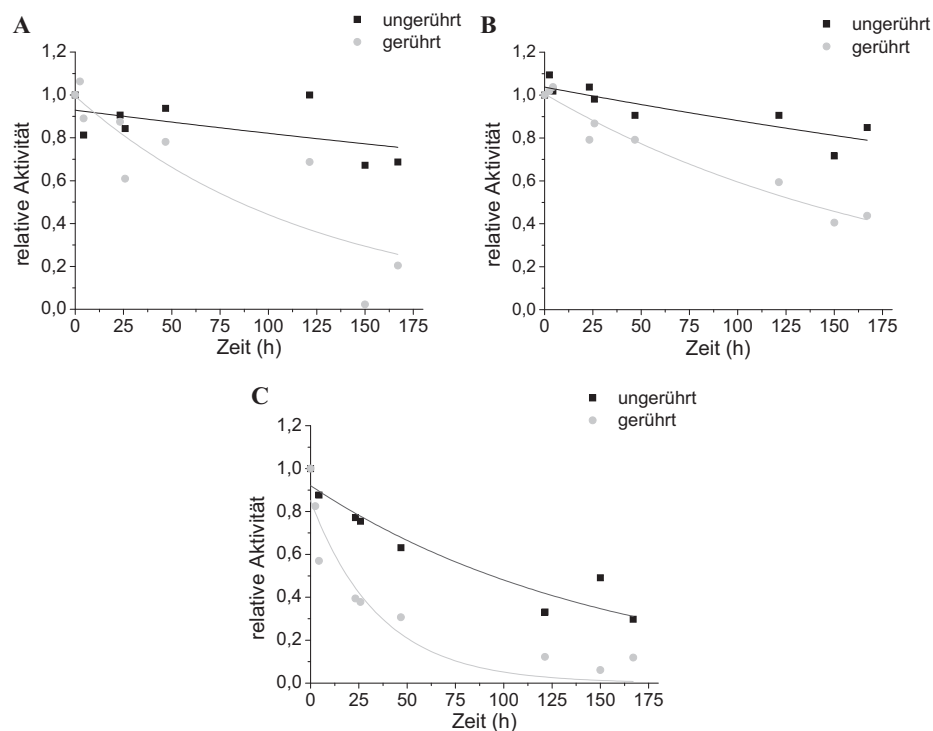


Abb. 54: Stabilität der BAL unter Rühren mit Puffer, MIBK gesättigtem Puffer und MIBK als zweiter Phase. A: Enzym/Puffer Lösung (1 ml), B: Enzym/Puffer MIBK gesättigt (1ml), C: Enzym/Puffer MIBK gesättigt (0,5 ml) mit 0,5 ml MIBK. Magnetrührer 1400 Upm; 0,5 mg/ml BAL in 50 mM Kpi-Puffer, pH 8; 0,1 mM ThDP; 2,5 mM MgSO₄; T=25 °C; n=1. Die Anpassung der Daten erfolgte mit Origin 8.0 unter Verwendung der Gleichung 5.

Aus der exponentiellen Anpassung der Daten, können die jeweiligen Halbwertszeiten berechnet werden (Kapitel 3.10.4). Aufgrund der hohen Messschwankungen der gerührten Pufferproben (Abb. 54 A) sind die berechneten Werte sehr ungenau, dies spiegelt sich in den hohen Standardabweichungen wider (Tabelle 9). Die angegebenen Standardabweichungen von k_{des} beschreiben eine mögliche Abweichung des berechneten Wertes aus einem Datensatz und stellen keine empirisch ermittelte Standardabweichung dar. Für die ungerührten Proben mit Puffer oder MIBK gesättigten Puffer wird die Halbwertszeit im Messzeitraum nicht

erreicht, so dass diese Werte nur als Anhaltspunkt für die Stabilität der BAL in diesen Systemen genutzt werden können.

Tabelle 9: Desaktivierungskonstanten (k_{des}) und Halbwertszeiten der BAL in den gerührten und nicht gerührten Proben. Die Daten wurden mittels exponentieller Anpassung der Daten aus Abb. 54 ermittelt.

Lösung		$k_{\text{des}} \text{ h}^{-1}$	Halbwertszeit [h]
Puffer	ungerührt	$0,00123 \pm 0,0008$	839 ± 679
	gerührt	$0,00811 \pm 0,0025$	91 ± 30
Puffer/MIBK gesättigt	ungerührt	$0,00163 \pm 0,0004$	443 ± 112
	gerührt	$0,00524 \pm 0,0005$	133 ± 13
Zweiphasen	ungerührt	$0,0065 \pm 0,001$	108 ± 17
	gerührt	$0,02804 \pm 0,007$	26 ± 7

Im Vergleich zu anderen Studien weist die BAL in Puffer, mit einer Halbwertszeit von über 170 Stunden, eine sehr hohe Stabilität auf. Die Literaturangaben für die Pufferstabilität der BAL variieren zwischen 10 und 82 Stunden (Domínguez de María *et al.*, 2006, Kokova, 2009, Mikolajek *et al.*, 2009, Stillger, 2004, van den Wittenboer, 2009). Innerhalb dieser Zeiträume konnte in dieser Arbeit eine Inaktivierung der BAL bis maximal 20% in Puffer ermittelt werden. Innerhalb von 24 Stunden war die ermittelte Inaktivierung bei 25 °C immer unterhalb von 10% (Kapitel 4.1.1 und 4.1.2). Eine molekulare Toxizität des Lösungsmittels MIBK gegenüber der BAL liegt nicht vor, wohingegen eindeutig eine Phasentoxizität besteht. Bei Emulgierung der Phasen beträgt die Halbwertszeit noch 25 Stunden. Die Literaturdaten mit MTBE als organischem Lösungsmittel sind zwar sehr unterschiedlich (Kapitel 1.5) aber insgesamt sind relativ hohe Halbwertszeiten für die BAL beschrieben. In gerührten, nicht emulgierten Zweiphasensystemen sind Halbwertszeiten von 15 Stunden (Grenzfläche: $3,14 \text{ cm}^2$) (van den Wittenboer, 2009) über 182 Stunden (Grenzfläche: 26 cm^2) bis 883 bzw. 887 Stunden (Grenzfläche: 13 cm^2 bzw. $2,5 \text{ cm}^2$) (Kühl, 2009) bei 20-25 °C angegeben. Für emulgierte Systeme mit MTBE sind Halbwertszeiten von 100 Stunden bei 20 °C (Kühl, 2009) und 815 Stunden bei 4°C (Stillger, 2004) beschrieben. In allen Systemen wurde ein Magnetrührer mit Rührfisch eingesetzt. Die Volumina waren mit 4 ml (Stillger, 2004) bzw. 10 ml (Kühl, 2009, van den Wittenboer, 2009) insgesamt größer als in der vorliegenden Studie, die Inaktivierung durch den Rührprozess selbst wurde nicht untersucht. Auffällig bei den Arbeiten von Stillger und Kühl ist, dass die Halbwertszeiten der BAL im Zweiphasensystem, auch bei Emulgierung, gegenüber den Halbwertszeiten in reinem Puffer um ein Vielfaches erhöht sind. Eine solche Stabilisierung konnte weder in der vorliegenden Arbeit noch bei van den Wittenboer gefunden werden. Worin diese Unterschiede begründet sind ist unklar, eine mögliche Ursache könnte bereits in der Aufarbeitung der Enzyme liegen.

Indes wird deutlich, wie wichtig die Analyse aller Faktoren auf die Enzymstabilität ist, um hinsichtlich spezifischer Parameter qualitative und quantitative Aussagen treffen zu können.

Fazit: Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass der Rührprozess, sowie die Phasengrenzfläche zur Inaktivierung der BAL beitragen. Die Emulgierung der beiden Phasen beschleunigt die Inaktivierung um etwa den Faktor vier, was vermutlich auf Rühreffekte und die Vergrößerung der Grenzfläche zurückzuführen ist. Diese Daten liegen etwa in der Größenordnung, welche Kühl für die Stabilität der BAL in Zweiphasensystemen mit getrennten und emulgierten Phasen beschrieben hat. Je nach Größe der Grenzfläche (bei getrennten Phasen), wies Kühl mit MTBE als zweiter Phase eine um das 1,8 bis fast 9-Fache beschleunigte Inaktivierung durch Emulgierung der beiden Phasen nach (Kühl, 2009). Die unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten (90 und 700 Upm) wurden dabei nicht mit einbezogen. Insgesamt bleibt festzuhalten, dass die BAL in wässrig-organischen Zweiphasen- und Emulsionssystemen ihre Aktivität über einen Zeitraum von mehreren Stunden aufrechterhalten kann.

4.1.4 Einfluss von Substraten auf die Stabilität der BAL

Anschließend sollte der Einfluss der aromatischen Aldehyde auf die Stabilität der BAL untersucht werden. Die ersten Versuche hierzu wurden von Carmen Kocot im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt (Kocot, 2010). Um zum einen die Löslichkeit der Aldehyde zu gewährleisten und zum anderen eine Präzipitation der entstehenden Benzoin-Derivate zu minimieren wurde dem Puffer 30 vol% DMSO zugesetzt. Vor und während der Inkubation der BAL mit den Aldehyden (Benzaldehyd, 3-Methoxybenzaldehyd und 2-Chlorbenzaldehyd) wurde die Aktivität der BAL mittels des fluoreszenzphotometrischen Tests ermittelt (Kapitel 3.9.1.3.1).

Bereits bei geringen Substratkonzentrationen von 4-5 mM zeigte die BAL eine schnelle Inaktivierung innerhalb weniger Minuten (10-60 min). Bei höheren Substratkonzentrationen (10-40 mM) konnte kein Unterschied in der Inaktivierung ermittelt werden. Auffällig war, dass die Inaktivierung für die verschiedenen Substrate unterschiedlich schnell verlief. Mit 2-Chlorbenzaldehyd war innerhalb von 10 Minuten keine Aktivität mehr nachweisbar, während mit Benzaldehyd und 3-Methoxybenzaldehyd die Restaktivität nach 60 Minuten noch etwa 30-40% betrug. Dies gab erste Hinweise darauf, dass die unterschiedlichen

Substrate auch einen unterschiedlichen Einfluss auf die BAL besitzen (Kocot, 2010). Dieser Aspekt sollte im Laufe der vorliegenden Arbeit weiter untersucht werden (Kapitel 4.2.1).

4.1.5 Umstellung des Test- und des Puffersystems zur Ermittlung der Stabilität der BAL gegenüber aromatischen Aldehyden

Aufgrund der Inkubation des Enzyms mit einem Substrat und der Ermittlung der Restaktivität mit einem anderen Substrat (3,5-Dimethoxybenzaldehyd), ist das beschriebene Testsystem nicht optimal für Bestimmung der tatsächlichen Restaktivität. Die Anwesenheit von verschiedenen Aldehyden kann zur Synthese von gemischten Benzoinen führen, was wiederum die gemessenen Aktivitäten verfälscht. Des Weiteren können die Mischprodukte einen unvorhersehbaren Einfluss auf die Fluoreszenz des 3,5-Dimethoxybenzaldehyds haben, was ebenfalls zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen würde. Deshalb wurde ein HPLC-basierter Test entwickelt, bei dem die BAL mit einer geringen Konzentration eines aromatischen Aldehyds inkubiert wird und die Restaktivität durch den Einsatz höherer Konzentrationen desselben Aldehyds ermittelt wird (Abb. 55 und Kapitel 3.10.3).

Des Weiteren ergaben sich Probleme bei der Verwendung des Kaliumphosphat-(Kpi) Puffers. Neben einer pH-Verschiebung in den alkalischen Bereich durch DMSO Zugabe, wurde bei Anwesenheit von 10-30 vol% DMSO eine Präzipitation von Magnesiumphosphat beobachtet. Magnesiumsulfat wird dem Puffer zugesetzt, weil es, neben ThDP, ein wichtiger Kofaktor der BAL ist. Bei höheren pH-Werten, z.B. pH 7,5-8 konnte teilweise sofort, spätestens nach 2 Tagen eine sichtbare Präzipitation nachgewiesen werden. Aber auch bei niedrigeren pH-Werten fand in vielen Fällen sofort nach Zugabe der aromatischen Substrate (v. a. den flüssigen wie 2-Chlor- und 3-Methoxybenzaldehyd) eine Präzipitation von Magnesiumphosphat statt. Eine Verringerung der MgSO_4 -Konzentration führte nur bedingt zu einer Verzögerung der Präzipitation. Außerdem zeigten Aktivitätsmessungen mit 3,5-Dimethoxybenzaldehyd, dass der Einsatz des essentiellen Kofaktors unterhalb von 1 mM zwar nicht zu einer verringerten Stabilität aber zu einer verringerten Aktivität der BAL führt. Bei der Bildung und Spaltung des unsubstituierten Benzoins wurde in vorangegangenen Arbeiten zwar kein Unterschied in der Aktivität bei Magnesiumkonzentrationen von 0,025-5 mM beobachtet (Janzen *et al.*, 2006, Stillger, 2004), jedoch scheint dies nicht für alle BAL katalysierten Reaktionen zu gelten. Deshalb wurden bei weiteren Versuchen in dieser Arbeit insgesamt hohe Kofaktorkonzentrationen (0,5 mM ThDP; 2,5mM MgSO_4) gewählt, um eine Limitierung der unterschiedlichen Reaktionen durch die Kofaktoren auszuschließen.

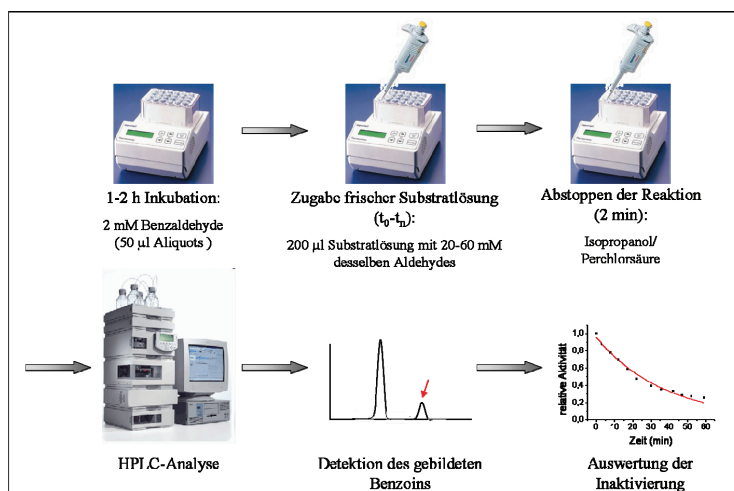


Abb. 55: Prinzip des HPLC-basierten Tests zur Ermittlung der Stabilität der BAL gegenüber aromatischen Aldehyden. Ein Inaktivierungsansatz mit 0,02 mg/ml BAL in Puffer mit 30 vol% DMSO und 2 mM eines Benzaldehyd-Derivats wird in 50 µl Aliquots aufgeteilt und bei 25 °C für 1-2 h inkubiert. Innerhalb dieser Zeit wird die relative Aktivität ermittelt, indem zu einem Aliquot 200 µl einer frischen Substratlösung mit 20-60 mM (abhängig von der Löslichkeit) desselben Aldehydes in Puffer mit 30 vol% DMSO zugegeben wird (BAL: 0,004 mg/ml). Nach zwei Minuten (innerhalb des linear verlaufenden Reaktionsbereichs) wird die Reaktion durch Zugabe von angesäuertem Isopropanol gestoppt und die Konzentration des entstandenen Produkts mittels HPLC-Analyse detektiert. Parallel wird der Anteil des Produkts im Inaktivierungsansatz ermittelt und bei der Berechnung der Aktivität berücksichtigt. Anhand der Produktbildung, kann die relative Aktivität zu den verschiedenen Zeitpunkten ermittelt und die Desaktivierungskonstante berechnet werden.

Der Kpi-Puffer selbst scheint hier nur ein metastabiles System darzustellen, welches durch Varianz in der Pufferzusammensetzung, wie Enzymzugabe und v. a. DMSO sowie Substratzugabe zu einer schnellen Präzipitation des Magnesiumphosphats führt. Hierdurch wird reproduzierbares Arbeiten unmöglich. Da bereits mit der BAL in Triethanolaminpuffer (TEA-Puffer) gearbeitet wurde (Stillger, 2004) und keine pH-Verschiebung durch den Zusatz von DMSO (Kapitel 3.2.2) beobachtet wurde und sich weder ein nennenswerter Unterschied in der Aktivität noch in der Stabilität innerhalb eines Messzeitraums von 4 Tagen gezeigt hatte, wurden die folgenden Messungen nur noch in TEA-Puffer durchgeführt.

4.1.6 Ermittlung des Einfluss von Benzaldehyd auf die Stabilität der BAL mittels des HPLC-basierten Testsystems

Mit einer Enzymkonzentration von 4 µg/ml BAL in 50 mM TEA-Puffer mit 30 vol% DMSO und 50 mM Benzaldehyd verlief die Reaktion innerhalb von 4 Minuten linear. Auch bei den zuvor mit 2 mM Benzaldehyd für 3-60 Minuten inkubierten und anschließend mit 200 µl einer 50 mM Benzaldehyd-Lösung versetzten Proben, verlief die Reaktion innerhalb der

ersten 4 Minuten stets linear. Innerhalb dieser Zeit können also die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten der BAL ermittelt und zur Bestimmung der Aktivität verwendet werden. Die Analyse der Inaktivierung erfolgte wie in Kapitel 3.10.3 beschrieben.

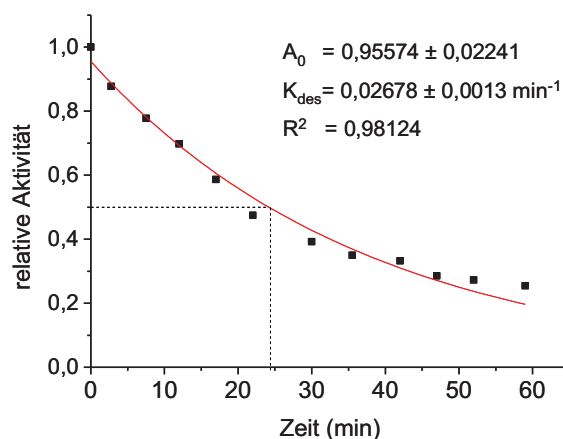


Abb. 56: Inaktivierung der BAL bei Inkubation mit 2 mM Benzaldehyd. Inaktivierungsansatz: 20 µg/ml BAL in 50 mM TEA-Puffer, pH 8; 0,5 mM ThDP, 2,5 mM MgSO₄; 30 vol% DMSO; 2 mM Benzaldehyd; T=25 °C. Reaktionsansatz zur Ermittlung der Aktivität: 50 µl des Inaktivierungsansatzes + 200 µl Benzaldehyd-Lösung (50 mM) in 50 mM TEA-Puffer, pH 8; 0,5 mM ThDP, 2,5 mM MgSO₄; 30 vol% DMSO. Die Anpassung der Daten erfolgte mit Origin 8.0 unter Verwendung der Gleichung 5. Die gestrichelten Linien geben die Zeit wieder, in der eine Inaktivierung von 50% erreicht wurde.

In zwei weiteren unabhängigen Experimenten wurden Desaktivierungskonstanten von $0,01676 \pm 0,00069 \text{ min}^{-1}$ und $0,03232 \pm 0,00059 \text{ min}^{-1}$ ermittelt. Daraus ergibt sich eine mittlere Inaktivierung von $2,5 \% \text{ min}^{-1}$ mit einer empirisch ermittelten Standardabweichung von $0,8 \% \text{ min}^{-1}$. Die Halbwertszeit der BAL bei Inkubation mit 2 mM Benzaldehyd beträgt somit $29,5 \pm 10,4 \text{ min}$.

Fazit: Die schnelle Inaktivierung der BAL konnte also auch mit diesem Test bestätigt werden. In beiden Experimenten (vgl. Kapitel 4.1.4) konnte gezeigt werden, dass die BAL bereits bei geringen Substratkonzentrationen (2-5 mM) innerhalb weniger Minuten fast vollständig inaktiviert wird. Im Vergleich zum emulgierten Zweiphasensystem mit MIBK ist die Inaktivierung also bereits bei geringen Substratkonzentrationen um etwa den Faktor 50 erhöht. Ein organisches Lösungsmittel als zweite Phase einzusetzen, welches zu geringeren Substratkonzentrationen in der wässrigen (reaktiven) Phase führt, könnte also keine entscheidende Stabilisierung der BAL bewirken (Kapitel 1.2.3). Im Gegenteil führt eine

geringe Substratkonzentration, weit unterhalb der erreichbaren maximalen Geschwindigkeit, zu einer verminderten Reaktionsrate.

4.1.7 Einfluss aromatischer Aldehyde auf die Stabilität der BFDH281A

Basierend auf dem Testsystem zur Ermittlung der Inaktivierungsrate der BAL durch die aromatischen Aldehyde, wurde ein analoger Test für die BFDH281A entwickelt. Für die BFDH281A konnte in einem Zeitraum von 4-5 Tagen keine Inaktivierung durch Benzaldehyd (2 mM und 50 mM) sowie des zusätzlich getesteten 4-Fluorbenzaldehyd (2 mM) ermittelt werden (Kocot, 2010).

4.2 Analyse der Enzym-inaktivierenden Effekte durch verschiedene aromatische Aldehyde

Die Vermutung, dass die geringe Prozessstabilität der BAL auf die Anwesenheit der Aldehyde zurückzuführen ist, konnte also bestätigt werden. Des Weiteren ergaben Vorversuche einen ersten Hinweis auf einen unterschiedlichen Einfluss verschieden substituierter Aldehyde auf die Inaktivierung der BAL (Kocot, 2010). Im Folgenden sollte dies und weitere Einflussfaktoren auf die Inaktivierung der BAL durch die Substrate untersucht werden.

Für die Inaktivierungsanalysen der BAL gegenüber aromatischen Aldehyden wurden Chlor-, Brom-, Fluor-, Methyl-, Methoxy- und Nitro-Gruppen als Substituenten am aromatischen Ring ausgewählt. Diese Gruppen besitzen unterschiedliche Elektronegativitäten, welche sich unter anderem aus Kernladung und Atomradius ergibt. Die Elektronegativität gibt einen Hinweis auf die Reaktivität der Gruppen und könnte somit ausschlaggebend für die unterschiedliche Inaktivierung der BAL durch die Substrate sein. Des Weiteren sind die sterischen Anforderungen sehr unterschiedlich ausgeprägt. In Abb. 57 sind die Strukturformeln für Benzaldehyd, mit den möglichen Substituenten in *meta*-, *para*- und *ortho*-Position abgebildet.

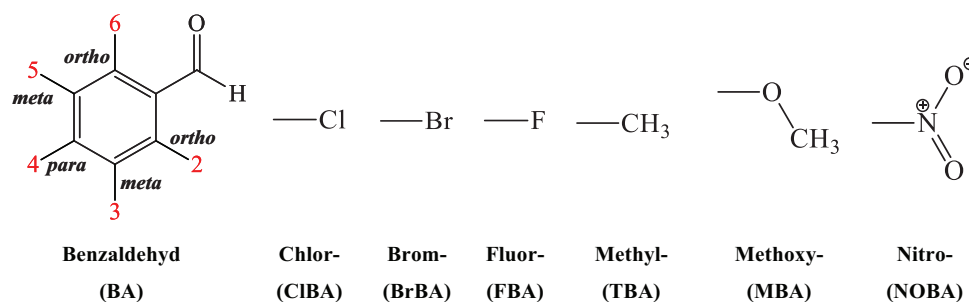


Abb. 57: In dieser Arbeit verwendete Benzaldehyd-Derivate (die verwendeten Abkürzungen sind in Klammern angegeben).

4.2.1 Inaktivierung der BAL durch verschiedene Benzaldehyd-Derivate

Die Inaktivierungsanalysen wurden wie in Kapitel 3.10.3 beschrieben durchgeführt. Aufgrund der Vielzahl an untersuchten Aldehyden, wurde in der Regel nur ein Experiment pro Substrat durchgeführt. Da die substituierten Benzoinen nicht käuflich zu erwerben sind und eine Synthese und anschließende Reinigung für eine Kalibrierung zu zeitaufwändig gewesen wäre, konnte keine quantitative Analyse der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten durchgeführt werden. Deshalb wurde für die Bestimmung der relativen Aktivität die Fläche der Produktsignale herangezogen und diese miteinander verglichen. Nicht für alle Substrate lagen kinetische Parameter aus anderen Arbeiten vor. Die Substratkonzentrationen zur Ermittlung der relativen Aktivität wurden daher im Rahmen ihrer Löslichkeit möglichst hoch gewählt. Die Aktivität der BAL war gegenüber manchen Substraten (z.B. 2-Methoxy- 2-Methyl- und 3-Nitrobenzaldehyd) trotzdem sehr gering und lag innerhalb eines geeigneten Messzeitraums unterhalb der Nachweisgrenze. In diesen Fällen wurde die Enzymkonzentration zur Ermittlung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten angepasst. Da der Aktivitätstest mit dem gleichen Substrat durchgeführt wurde, welches auch für die Inaktivierung verwendet wurde, wurden Aldehyde gegenüber denen die BAL unter den gewählten Bedingungen keinerlei Aktivität aufwies (z.B. 2-Nitrobenzaldehyd) oder die Löslichkeit nicht ausreichte, um sinnvolle Messungen zu gewährleisten (z.B. 3,5-Dibrombenzaldehyd) nicht in die Untersuchungen mit einbezogen. Eine Übersicht über die Reaktionsbedingungen für alle untersuchten Aldehyde ist in Tabelle 7 (Kapitel 3.10.3) zusammengefasst.

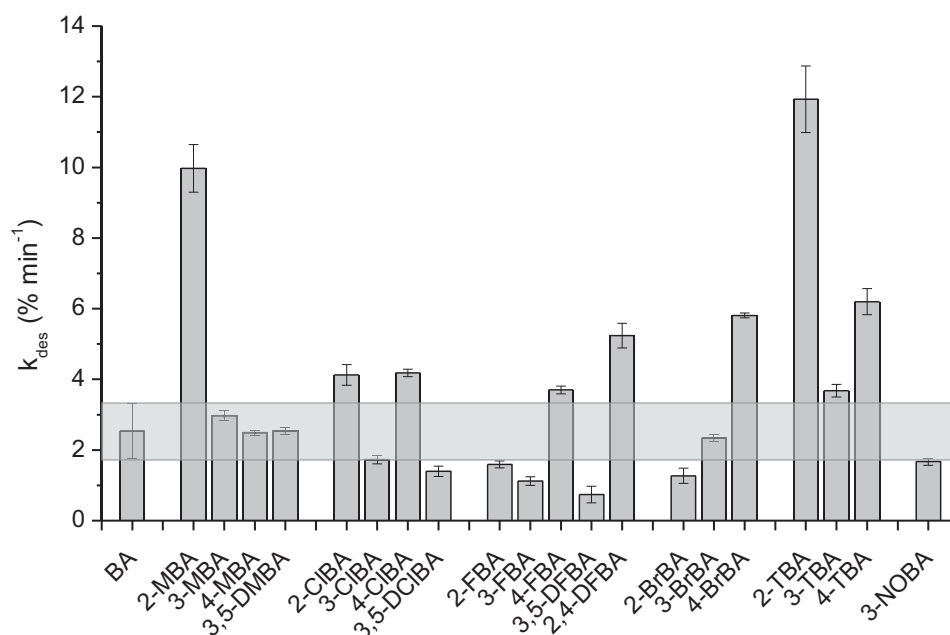


Abb. 58: Desaktivierungskonstanten der BAL gegenüber verschiedenen aromatischen Aldehyden. Inaktivierungsansatz: 20 µg/ml BAL in 50 mM TEA-Puffer, pH 8; 0,5 mM ThDP, 2,5 mM MgSO₄; 30 vol% DMSO; 2 mM Substrat; T=25 °C (BAL-Konzentration tlw. abweichend, siehe hierzu Tabelle 10). Reaktionsansätze zur Ermittlung der Aktivität: siehe Tabelle 7. Die angegebene Standardabweichung für Benzaldehyd bezieht sich auf die empirisch ermittelte Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten und ist zur Veranschaulichung als grauer Kasten dargestellt. Alle anderen Standardabweichungen ergeben sich aus der Berechnung von k_{des} eines Experiments.

Aus den ermittelten Desaktivierungskonstanten wird deutlich, dass die Elektronegativität der Substituenten keinen Einfluss auf den Grad der Inaktivierung besitzt. Innerhalb jeder Gruppe gibt es Substrate, die im Vergleich zum Benzaldehyd zu einer schnelleren, vergleichbaren oder teilweise sogar geringeren Inaktivierung der BAL führen.

Auch die Position des Substituenten scheint nur bedingt einen Einfluss auf die Inaktivierung der BAL zu haben. Während 2-Methoxybenzaldehyd (k_{des} : 10% min⁻¹) und 2-Methylbenzaldehyd (k_{des} : 11,9% min⁻¹) zu einer signifikant erhöhten Inaktivierungsrate relativ zu Benzaldehyd (k_{des} : 2,5% min⁻¹) führen, ist die Inaktivierung mit 2-Chlorbenzaldehyd (k_{des} : 4,1% min⁻¹) nur geringfügig erhöht. Die Ergebnisse für 2-Fluorbenzaldehyd (k_{des} : 1,6% min⁻¹) und 2-Brombenzaldehyd (k_{des} : 1,3% min⁻¹) zeigen sogar eine evt. verbesserte Stabilität auf. Ähnliches gilt für Substitutionen in *ortho*-Position; während 4-Brombenzaldehyd (k_{des} : 5,8% min⁻¹) und 4-Methylbenzaldehyd (k_{des} : 6,2% min⁻¹) zu einer relativ schnellen Inakti-

vierung führen, ist die Inaktivierungsrate mit 4-Chlorbenzaldehyd (k_{des} : 4,2% min⁻¹) und 4-Fluorbenzaldehyd (k_{des} : 3,7% min⁻¹) im Vergleich zu Benzaldehyd nur unwesentlich erhöht. Auch die Inaktivierung mit 4-Methoxybenzaldehyd (k_{des} : 2,5% min⁻¹) ist vergleichbar mit der von Benzaldehyd. Einzig Substitutionen in *meta*-Position ergaben in keinem Fall eine eindeutige Beschleunigung der Inaktivierungsrate. Hier ist die Stabilität der BAL gegenüber 3-Methoxy-, 3,5-Dimethoxy-, 3-Chlor-, 3,5-Dichlor-, 3-Fluor-, 3,5-Difluor- und 3-Brombenzaldehyd vergleichbar oder sogar höher als gegenüber Benzaldehyd. Nur mit 3-Methylbenzaldehyd (k_{des} : 3,7% min⁻¹) ist eine geringfügig erhöhte Inaktivierungsrate ermittelt worden, welche vermutlich im Rahmen der Messgenauigkeit nicht signifikant ist.

Tabelle 10: Übersicht über die ermittelten Desaktivierungskonstanten und berechneten Halbwertszeiten mit verschiedenen Benzaldehyd-Derivaten. Weitere experimentelle Daten, wie Enzymkonzentrationen, maximaler Umsatz und Reaktionsgeschwindigkeit im Inaktivierungsansatz sind angegeben.

Substrat	BAL [mg/ml]	Maximaler Umsatz mit 2 mM Substrat [%]	Zeit bis zum maximalen Umsatz [min]	k_{des} [% min ⁻¹]	Standard- abweichung [% min ⁻¹]	Halbwertszeit [min]
BA	0,02	40	< 2	2,53	± 0,79	29,5 ± 10,4
2-MBA	0,45	40	15	9,97	± 0,67	7,2 ± 0,5
3-MBA	0,02	50	< 2	2,97	± 0,15	23,4 ± 1,2
4-MBA	0,02	10	< 2	2,49	± 0,07	27,8 ± 0,1
3,5-DMBA	0,02	60	< 2	2,54	± 0,10	27,3 ± 1,1
2-CIBA	0,02	30	10	4,12	± 0,29	16,9 ± 1,2
3-CIBA	0,02	60	5	1,73	± 0,12	40,2 ± 2,8
4-CIBA	0,02	40	< 3	4,18	± 0,10	16,6 ± 0,4
3,5-DCIBA	0,02	80	16	1,40	± 0,15	49,9 ± 5,4
2-FBA	0,02	55	70	1,59	± 0,10	43,7 ± 2,8
3-FBA	0,02	50	44	1,12	± 0,12	58,2 ± 5,8
4-FBA	0,02	30	< 2	3,70	± 0,11	18,7 ± 0,6
3,5-DFBA	0,02	60	85	0,74	± 0,23	100,3 ± 32,7
2,4-DFBA	0,02	55	10	5,24	± 0,35	13,3 ± 0,9
2-BrBA	0,02	15	50	1,27	± 0,22	55,7 ± 9,8
3-BrBA	0,02	60	2	2,34	± 0,10	29,7 ± 1,3
4-BrBA	0,02	45	< 2,5	5,81	± 0,07	11,9 ± 0,1
2-TBA	0,45	15	15	11,93	± 0,94	5,8 ± 0,5
3-TBA	0,02	40	< 2	3,68	± 0,18	18,9 ± 0,9
4-TBA	0,02	30	< 2	6,20	± 0,37	11,2 ± 0,7
3-NOBA	0,45	75	< 2	1,67	± 0,10	41,6 ± 2,5
4-NOBA	2	60	60	19,8 (pH 7)	± 9,60	4,2 ± 2,3

Weiterhin ist aus Tabelle 10 ersichtlich, dass die erreichten Umsätze sowie die Geschwindigkeit für die Umsetzung der einzelnen Substrate sehr unterschiedlich sind. Aber weder die erreichten Umsätze noch die Geschwindigkeiten korrelieren mit der Inaktivierung der BAL durch das Substrat.

Auch ist kein Hinweis darauf zu finden, dass die sterisch anspruchsvolleren Substrate, wie Methoxy- oder Nitrobenzaldehyde zu einer beschleunigten oder verminderten Inaktivierungsrate führen. Während Methoxy-Substituenten in *meta*- und *para*-Position zu keinem Unterschied in der Inaktivierung im Vergleich zu Benzaldehyd führen, ist die Inaktivierung mit 2-Methoxybenzaldehyd signifikant erhöht. Ein Vergleich der Inaktivierung der BAL durch 3-Nitro- und 4-Nitrobenzaldehyd (ohne Abb., vgl. Tabelle 10) weist ebenfalls eine immense Differenz in der Inaktivierung auf. Während die Sensitivität der BAL gegenüber 3-Nitrobenzaldehyd vergleichbar mit Benzaldehyd ist, ist die Inaktivierung mit 4-Nitrobenzaldehyd ($k_{\text{des}}: 19,8\% \text{ min}^{-1}$) fast 8-mal schneller (Messung bei pH 7, da bei pH 8 keine Ligaseaktivität vorlag).

Fazit: Die Vermutung, dass unterschiedliche Substrate auch zu Unterschieden in der Inaktivierungsrate führen, konnte bestätigt werden. In allen Fällen war eine signifikante Inaktivierung innerhalb einer Stunde festzustellen. Die ermittelten Halbwertszeiten liegen im Bereich von etwa 4-100 Minuten. Dies entspricht den Untersuchungen von Kocot, bei denen ebenfalls eine schnelle Inaktivierung innerhalb von 60 Minuten sowie eine beschleunigte Inaktivierung der BAL durch 2-Chlorbenzaldehyd gegenüber Benzaldehyd und 3-Methoxybenzaldehyd beschrieben wurde (Kapitel 4.1.4, Kocot, 2010). Auch Zehentgruber und Kühl beobachteten in verschiedenen Reaktionssystemen, ein- sowie zweiphasig, mit oder ohne organischen Lösungsmitteln eine signifikante Inaktivierung der BAL innerhalb kürzester Zeit. Die ermittelten Restaktivitäten der BAL nach 30 Minuten lagen etwa zwischen 5% und 30%, wobei in Gegenwart von 2-Chlorbenzaldehyd jeweils eine schnellere Inaktivierung der BAL gegenüber der symmetrischen Benzoinsynthese mit 3-Methoxybenzaldehyd als einzigem Substrat gefunden wurde (Kühl, 2009, Zehentgruber, 2006).

Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Elektronegativität, dem sterischen Anspruch oder der Position des Substituenten und dem Grad der Inaktivierung konnte nicht gefunden werden. Auch ein Vergleich des Gesamtumsatzes oder der Geschwindigkeit der BAL gegenüber den verschiedenen Substraten, wies keine Korrelation der Inaktivierungsrate auf.

Die Inaktivierung der BAL durch die jeweiligen Substrate scheint also auch nicht auf ihre *total turnover frequency* zurückzuführen zu sein.

4.2.2 Einfluss des pH auf die Stabilität der BAL mit aromatischen Substraten

Für die Inaktivierung der BAL durch die Aldehyde sind verschiedene Prozesse denkbar (siehe Kapitel 4.2.3). Eine Inaktivierung von Enzymen, vor allem für Lipasen durch aliphatische Aldehyde wurde schon des Öfteren beschrieben. Hier wird vor allem die reversible Schiffbasen-Bildung an Lysinresten als Ausgangspunkt der Inaktivierung angenommen (Berger und Faber, 1991, Franken, 2008, Weber *et al.*, 1997). Dabei bindet der Aldehyd über eine Maillard-Typ Reaktion kovalent an die ϵ -Aminogruppe des Lysins (Donohue *et al.*, 1983, Ledl und Schleicher, 1990). Des Weiteren wird angenommen, dass die Schiffbasen-Bildung zu einer Konformationsänderung des Enzyms führen kann, welche dann in der Inaktivierung endet (Abb. 59).

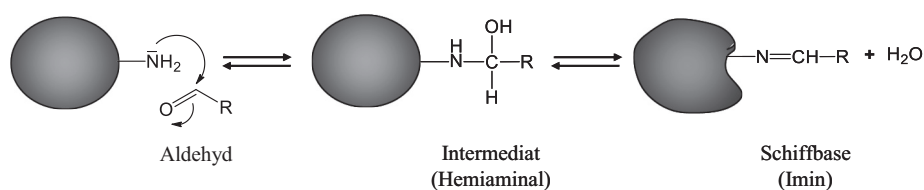


Abb. 59: Aldehyd-Inaktivierung durch Schiffbasenbildung nach (Weber *et al.*, 1997).

Für die Neigung eines solchen Lysinrestes zur Schiffbasenbildung werden zwei Faktoren herangezogen: zum einen die Nukleophilie der ϵ -Aminogruppe und zum anderen die Lösungsmittelzugänglichkeit. Die nicht berechenbare Nukleophilie steigt proportional zum berechenbaren pK_S -Wert an. Folglich bedeutet ein höherer pK_S -Wert eine höhere Neigung zur Schiffbasenbildung (Weber *et al.*, 1997). Gleichzeitig kann eine Schiffbasenbildung nur erfolgen, wenn die ϵ -Aminogruppe deprotoniert vorliegt. Der Protonierungszustand ist wiederum abhängig vom pK_S des Lysinrestes und dem Umgebungs-pH. Bei einem pH-Wert der gleich dem pK_S -Wert ist, liegen die Hälfte der ϵ -Aminogruppen protoniert und die andere Hälfte deprotoniert vor. Bei pH-Werten unterhalb des pK_S -Werts liegen die Aminogruppen überwiegend protoniert und umgekehrt bei pH-Werten oberhalb des pK_S -Werts überwiegend deprotoniert vor. Folglich wird die Wahrscheinlichkeit der Schiffbasenbildung gesenkt, wenn der Umgebungs-pH geringer ist als der pK_S -Wert des Lysinrestes. Sollte eine Inaktivierung

der BAL durch die Bildung solcher Schiffbasen hervorgerufen werden, muss eine Senkung des Umgebungs-pHs auch zu einer Stabilisierung der BAL gegenüber den Aldehyden führen.

Aufgrund der insgesamt sehr guten Aktivität der BAL gegenüber den *para*-substituierten Benzaldehyden und der damit einhergehenden vereinfachten Analyse sowie der voneinander abweichenden Inaktivierungsraten von $2,5\% \text{ min}^{-1}$ bis $6,2\% \text{ min}^{-1}$, wurde der Einfluss des pH-Werts zunächst für diese Substratgruppe untersucht. Die Inaktivierung sowie die Aktivitätsmessungen wurden bei pH 7 durchgeführt, alle anderen Parameter entsprachen den Experimenten in Kapitel 4.2.1.

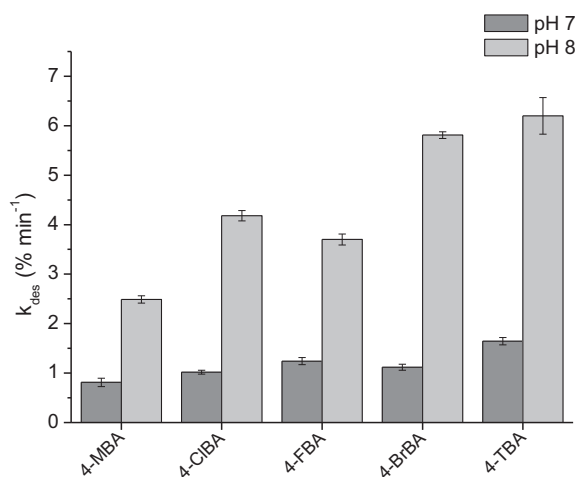


Abb. 60: Inaktivierungsraten der BAL mit *para*-substituierten Benzaldehyden bei pH 7 und pH 8 im Vergleich. Inaktivierungsansatz: 20 $\mu\text{g/ml}$ BAL in 50 mM TEA-Puffer, pH 7 und pH 8; 0,5 mM ThDP, 2,5 mM MgSO_4 ; 30 vol% DMSO; 2 mM Substrat; $T=25^\circ\text{C}$. Reaktionsansätze zur Ermittlung der Aktivität: siehe Tabelle 7. Die Standardabweichungen ergeben sich aus der Berechnung von k_{des} eines Experiments und stellen keine empirisch ermittelten Standardabweichungen dar.

Bereits bei einer Senkung des pH-Wertes um eine Einheit ist eine Stabilisierung der BAL um etwa das 3-5 Fache gegenüber den *para*-substituierten Benzaldehyden zu beobachten (Abb. 60). Für weitere Analysen wurde 4-Chlorbenzaldehyd aufgrund der hohen Aktivität und der damit vereinfachten Analytik ausgewählt. Zusätzlich sollten zwei weitere Aldehyde für vergleichende Analysen eingesetzt werden. Erstens sollte der unsubstituierte und in den meisten Arbeiten als Standardsubstrat verwendete Benzaldehyd näher untersucht werden, zweitens wurde 3,5-Dimethoxybenzaldehyd als sterisch sehr anspruchsvolles Substrat, welches zudem in den Arbeiten von Schmidt und Zavrel bereits charakterisiert wurde und in der vorliegenden Arbeit eine mit Benzaldehyd vergleichbare Inaktivierung gezeigt hatte, ausgewählt. Um signifikante Aussagen über die Unterschiede in der Inaktivierung treffen zu

können, wurde die Inaktivierungsrate bei pH 8 in zwei weiteren unabhängigen Experimenten für 4-Chlorbenzaldehyd und 3,5-Dimethoxybenzaldehyd ermittelt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Desaktivierungskonstanten und berechnete Halbwertszeiten für Benzaldehyd, 3,5-Dimethoxybenzaldehyd und 4-Chlorbenzaldehyd. Inaktivierungsansatz: 20 µg/ml BAL in 50 mM TEA Puffer, pH 8; 0,5 mM ThDP, 2,5 mM MgSO₄; 30 vol% DMSO; 2 mM Substrat; T=25 °C.

Substrat	Desaktivierungskonstante [% min ⁻¹]				Halbwertszeit [min]				
	1.	2.	3.	Mittlerer k _{des}	1.	2.	3.	Mittlere t _{1/2}	
BA	2,68	1,68	3,23	2,53 ± 0,79	25,9	41,3	21,5	29,5	± 10,4
3,5-DMBA	2,55	2,63	3,00	2,73 ± 0,24	27,2	26,4	23,1	25,5	± 2,2
4-CIBA	4,18	3,30	2,94	3,47 ± 0,64	16,6	21,0	23,6	20,4	± 3,5

Unter Berücksichtigung der empirischen Standardabweichung, ergibt sich kein signifikanter Unterschied in der Inaktivierungsrate der BAL mit den drei gewählten Benzaldehyden bei pH 8. Inwiefern sich jedoch Unterschiede bei anderen pH-Werten zeigen würden, sollte im Folgenden geprüft werden.

Bei Betrachtung der Stabilität der BAL gegenüber 4-Chlorbenzaldehyd über ein breiteres pH-Spektrum, wird der Einfluss des pH-Werts auf die Inaktivierung noch deutlicher als zuvor (Abb. 61 C). In TEA-Puffer (pH 6) (k_{des}: 0,2% min⁻¹), konnte sogar eine Stabilisierung um fast das 20-Fache gegenüber den Inaktivierungsanalysen bei pH 8 (k_{des}: 3,5% min⁻¹) erreicht werden; bei pH 7 (k_{des}: 1,0% min⁻¹) ist die Stabilität 3,5-4 fach höher. Während die Inkubation bei pH 9 (k_{des}: 5,7% min⁻¹) zu einer deutlich schnelleren Inaktivierung als bei pH 8 führt. Da mit den anderen Substraten, die eine Substitution in der *para*-Position tragen, bei pH 7 eine ähnliche Stabilisierung erreicht werden konnte, ist für diese ebenfalls eine ähnliche Stabilisierung durch weiteres Absenken des pH anzunehmen.

Gegenüber Benzaldehyd war bei pH 6 keine Ligaseaktivität der BAL detektierbar, deshalb wurde die Stabilität hier nicht bestimmt (Abb. 61 A). Mit einem Puffer-pH von 7 (k_{des}: 0,9% min⁻¹) konnte eine etwa um das 2,5-fach erhöhte Stabilität der BAL gegenüber pH 8 (k_{des}= 2,5% min⁻¹) erreicht werden. Durch Senkung des pH-Werts kann also auch gegenüber Benzaldehyd eine Stabilisierung erreicht werden. Im Vergleich zu den Untersuchungen mit 4-Chlorbenzaldehyd konnte keine signifikant erhöhte Inaktivierung mit Benzaldehyd bei pH 9 beobachtet werden.

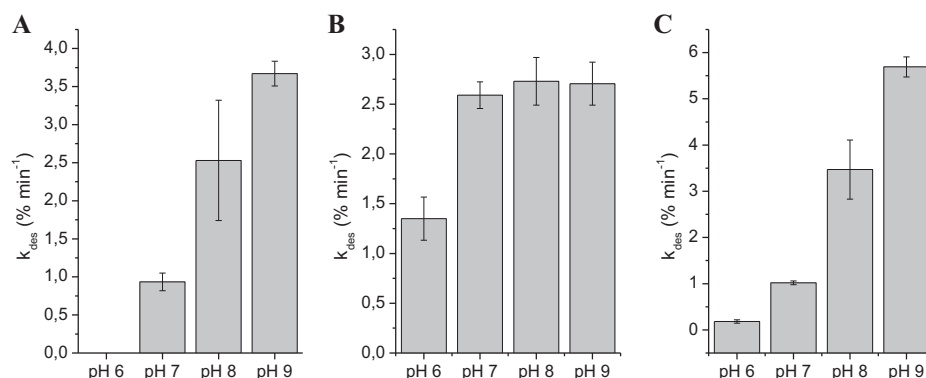


Abb. 61: Inaktivierungsraten der BAL mit Benzaldehyd (A), 3,5-Dimethoxybenzaldehyd (B) und 4-Chlorbenzaldehyd (C). Inaktivierungsansatz: 20 $\mu\text{g/ml}$ BAL in 50 mM TEA-Puffer, pH 6-9; 0,5 mM ThDP, 2,5 mM MgSO_4 ; 30 vol% DMSO; 2 mM Substrat; $T=25^\circ\text{C}$. Reaktionsansätze zur Ermittlung der Aktivität: siehe Tabelle 7. Die Standardabweichungen bei Puffer pH 8 beziehen sich auf die empirisch ermittelten Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die anderen Standardabweichungen ergeben sich aus der Berechnung von k_{des} eines Experiments und stellen keine empirisch ermittelten Standardabweichungen dar.

Die Inaktivierungsstudien mit 3,5-Dimethoxybenzaldehyd zeigten demgegenüber ein etwas anderes Bild. Hier konnte eine Stabilisierung um den Faktor zwei, erst bei einem pH-Wert von 6 (k_{des} : 1,4% min⁻¹) erreicht werden, während mit pH 7 (k_{des} : 2,6% min⁻¹) und pH 9 (k_{des} : 2,7% min⁻¹) keine Veränderung in der Inaktivierung zu beobachten war (Abb. 61). Dies verdeutlicht, wie unterschiedlich die Substrate auf die BAL wirken, gibt aber noch keinen eindeutigen Hinweis auf den Mechanismus der Inaktivierung.

Fazit: Da die Inaktivierungsrate der BAL mit allen untersuchten Aldehyden eine pH-Abhängigkeit zeigt, auch wenn diese sehr unterschiedlich ausgeprägt ist, kann die Schiffbasenbildung als eine Ursache der Inaktivierung durchaus in Frage kommen.

4.2.3 Reaktivierung nach Entfernung der Aldehyde

Die Inaktivierung der BAL durch die Substrate könnte, wie bereits erwähnt, durch verschiedene Prozesse hervorgerufen werden. Eine Möglichkeit ist die bereits beschriebene Bildung von Schiffbasen zwischen Aldehyd und der ϵ -Aminogruppe von Lysin oder dem N-Terminus, die in einer Konformationsänderung des Enzyms resultieren könnte. Diese Bindung ist allerdings sehr instabil und kann leicht hydrolysieren (Abb. 59). Darüber hinaus kommen auch kinetische Ursachen für die Inhibierung der Ligasereaktion, z.B. durch eine Blockierung des aktiven Zentrums durch einen kompetitiven oder nicht-kompetitiven Inhibitor in Betracht,

wobei eine typische Substratüberschussinhibierung ausgeschlossen werden kann, da diese bisher nie beobachtet wurde (Janzen, 2002, Kühl, 2009, Stillger, 2004). Eine stabile kovalente Bindung des Aldehyds am Enzym, z.B. direkt im aktiven Zentrum könnte zu einer Blockierung der Reaktion oder an anderen Positionen zu strukturellen Veränderungen und damit zur Inaktivierung führen. Sollte die beobachtete Inaktivierung durch eine kovalente Bindung der Substrate am Enzym hervorgerufen werden, könnten diese Verbindungen nicht durch Umpufferung wieder gelöst und eine Reaktivierung erreicht werden.

Reaktivierungsversuche könnten also Aufschluss darüber geben, ob es sich um einen reversiblen Prozess handelt oder ob eine irreversible Inaktivierung über stabile kovalente Bindung am Enzym vorliegt. Zusätzlich zu den gewählten Standardaldehyden, wurde auch die Reaktivierung mit zwei *ortho*-substituierten Benzaldehyden untersucht. Dem 2-Chlorbenzaldehyd ($k_{\text{des}}: 4,1\% \text{ min}^{-1}$), mit welchem die BAL eine ähnlich Inaktivierungsrate wie mit 4-Chlorbenzaldehyd ($k_{\text{des}}: 3,5\% \pm 0,6 \text{ min}^{-1}$) aufweist und dem 2-Methoxybenzaldehyd ($k_{\text{des}}: 10\% \text{ min}^{-1}$), welcher zu einer erhöhten Inaktivierungsrate der BAL führt (Abb. 58).

Nach Inkubation mit 2 mM der Substrate erfolgte die Abtrennung des Enzyms von den Aldehyden mittels Gelfiltration über PD-10 Säulen (GE-Healthcare, Schweden). Für die Inaktivierung wurde ein Ansatz mit 0,5 mg/ml BAL gewählt, um nach der Elution von der Säule eine ausreichend hohe Enzymkonzentration für die anschließenden Aktivitätsmessungen zu gewährleisten. Die HPLC-Analyse der eluierten Proben ergab keine nachweisbaren Mengen der Aldehyde oder Benzoinen, die Trennung war also erfolgreich (Kapitel 3.11). Die in Tabelle 12 angegebenen relativen Aktivitäten sind anhand der Ausgangsaktivität vor der Inaktivierung ermittelt worden. Eine mitgeführte Kontrolle der BAL ohne Substratzugabe zeigte keine Inaktivierung im Messzeitraum oder durch die Gelfiltration.

Mit den *ortho*-substituierten Benzaldehyden ist nach zwei Stunden eine fast vollständige Inaktivierung erreicht. Während die Inaktivierung mit Benzaldehyd, 3,5-Dimethoxybenzaldehyd und 4-Chlorbenzaldehyd in diesem Zeitraum nicht vollständig war. Dessen ungeachtet konnte nach der Entfernung von allen untersuchten Aldehyden zumindest eine partielle Reaktivierung der BAL beobachtet werden (Tabelle 12).

Tabelle 12: Reaktivierungsversuche der BAL nach 2 Stunden Inkubation mit aromatischen Aldehyden.
 Inaktivierung: 0,5 mg/ml BAL in 50 mM TEA-Puffer, pH 8; 0,5 mM ThDP, 2,5 mM MgSO₄; 30 vol% DMSO; 2 mM Substrat; T=25 °C. Reaktivierung (Elution und Inkubation nach Elution): 50 mM TEA-Puffer, pH 8; 0,5 mM ThDP, 2,5 mM MgSO₄. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Experimente nur einmal durchgeführt.

Substrat	Relative Aktivität			
	2 h nach Inaktivierung [%]	1 h nach Elution [%]	2 h nach Elution [%]	24 h nach Elution [%]
2-MBA (n=2)	5	36	41	98
2-CIBA (n=2)	3	28	33	29
BA	29	n.b.	79	50
3,5-DMBA	10	n.b.	36	34
4-CIBA	27	n.b.	61	71

n.b.: nicht bestimmt

In der mit 2-Methoxybenzaldehyd inaktivierten Probe konnte sogar eine vollständige Reaktivierung innerhalb von 24 Stunden erreicht werden. Innerhalb von zwei Stunden und 24 Stunden Inkubation im Elutionspuffer konnte bei den weiteren untersuchten Aldehyden keine entscheidende Zunahme der Aktivität festgestellt werden. Mit Benzaldehyd als Substrat wurde nach 24 Stunden sogar eine geringere Aktivität ermittelt, als nach zwei Stunden Inkubation im Elutionspuffer. Ob dies auf Messungenauigkeiten oder Verunreinigungen in der Probe begründet ist, ist nicht geklärt. Eine mit 2-Chlorbenzaldehyd inaktivierte Probe wurde zusätzlich zweimal hintereinander über PD-10 Säulen gereinigt. Innerhalb von 24 Stunden wurde kein Unterschied in der Reaktivierung der einfach sowie zweifach gereinigten Probe ermittelt. Wie auch im ersten Versuch (Tabelle 12), betrug die Reaktivierung etwa 30%. Es kann also davon ausgegangen werden, dass alle freien Aldehyde bereits im ersten Reinigungsschritt entfernt wurden.

Für 3,5-Dimethoxybenzaldehyd und 4-Chlorbenzaldehyd wurden die Versuche noch einmal wiederholt. Diesmal wurde die BAL für 24 Stunden mit 2 mM der Substrate inkubiert und anschließend durch Gelfiltration von den Reaktanden abgetrennt. Nach zwei Stunden Inkubation mit den Aldehyden war, wie in den Versuchen zuvor, die Inaktivierung der BAL nicht vollständig. Innerhalb von 24 Stunden war aber mit beiden Aldehyden eine fast vollständige Inaktivierung erreicht (Tabelle 13).

Tabelle 13: Reaktivierungsversuche der BAL nach 24 Stunden Inkubation mit 3,5-Dimethoxybenzaldehyd und 4-Chlorbenzaldehyd. Inaktivierung: 0,5 mg/ml BAL in 50 mM TEA-Puffer, pH 8; 0,5 mM ThDP, 2,5 mM MgSO₄; 30 vol% DMSO; 2 mM Substrat; T=25 °C. Reaktivierung (Elution und Inkubation nach Elution): 50 mM TEA-Puffer, pH 8; 0,5 mM ThDP, 2,5 mM MgSO₄.

Substrat	Relative Aktivität				
	2 h nach Inaktivierung [%]	24 h nach Inaktivierung [%]	2 h nach Elution [%]	24 h nach Elution [%]	48 h nach Elution [%]
3,5-DMBA	14	1	12	25	26
4-CIBA	39	6	14	24	24

Nach Reinigung der BAL von den freien Aldehyden konnte innerhalb von 24 Stunden in beiden untersuchten Fällen eine Aktivität von etwa 25% wiedergewonnen werden. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation war keine weitere Reaktivierung zu beobachten. Die maximale Reaktivierung entspricht in etwa der ermittelten Reaktivierung mit 2-Chlorbenzaldehyd. Außer nach Inaktivierung mit 2-Methoxybenzaldehyd, dem gegenüber die BAL eine besonders hohe Sensitivität mit einer Inaktivierungsrate von 10% min⁻¹ zeigt, konnte also nur eine partielle Reaktivierung erreicht werden.

Eine Verdünnung der Inaktivierungsansätze in Elutionspuffer (bis 1:20), führte in keinem Fall zu einer detektierbaren Reaktivierung der BAL. Die Entfernung der Aldehyde aus dem Inaktivierungsansatz ist für eine Reaktivierung bei konstantem Puffer pH also zwingend notwendig. Allerdings konnte bei Senkung des pH-Werts auf pH 6 durch Titration mit HCl, nach erfolgter Inaktivierung mit 2-Methoxybenzaldehyd eine partielle Reaktivierung beobachtet werden (bis zu 40%). Dies untermauert die Möglichkeit der Inaktivierung durch Schiffbasenbildung, da Schiffbasen durch das Ansäuern hydrolysiert werden und somit ebenfalls eine Trennung der Aldehyde vom Enzym erreicht wird. Gegenüber der Reaktivierung durch Abtrennung des 2-Methoxybenzaldehyds von der BAL mittels Gel-filtration (Reaktivierung: 98%), konnte durch die Ansäuerung der inaktivierten Probe nur eine partielle Reaktivierung beobachtet werden (Reaktivierung: 40%). Bei pH 6 scheint also immer noch eine Reaktion des Aldehyds mit der potentiellen Bindeposition möglich zu sein.

Während der Versuche ist eine weitere und bisher nur am Rande erwähnte Auffälligkeit aufgetreten. Mit Benzaldehyd, 4-Chlorbenzaldehyd und 3,5-Dimethoxybenzaldehyd ist die Inaktivierung innerhalb von zwei Stunden weitaus geringer als mit 2-Chlor- und 2-Methoxybenzaldehyd, obwohl 2-Chlor- und 4-Chlorbenzaldehyd zuvor vergleichbare Desaktivierungskonstanten bzw. Halbwertszeiten gezeigt haben (vgl. Tabelle 10 und Tabelle 11). Dement-

sprechend wäre mit beiden Substraten nach 2 Stunden eine fast vollständige Inaktivierung der BAL zu erwarten gewesen. Gleiches gilt für Benzaldehyd und 3,5-Dimethoxybenzaldehyd. Im Rahmen der Messgenauigkeit weichen die ermittelten Inaktivierungsraten und Halbwertszeiten nur geringfügig von den Versuchen mit 2-Chlorbenzaldehyd ab. Zu den vorherigen Inaktivierungsexperimenten und den Reaktivierungsversuchen gibt es nur einen Unterschied: die Enzymkonzentration. Bei den in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Versuchen wurden 0,02 mg/ml BAL mit 2 mM Substrat inkubiert, in den Reaktivierungsexperimenten wurden 0,5 mg/ml BAL mit 2 mM Substrat inkubiert.

Fazit: Eine denkbare Erklärung für die Differenzen bei der Reaktivierung wäre z.B. ein zweiter irreversibler Inaktivierungsschritt, wie der Verlust der strukturellen Integrität, der abhängig vom Substrat und vom pH eingeleitet wird. Möglicherweise wird aber auch die initiale Inaktivierung selbst durch unterschiedliche Prozesse hervorgerufen, welche abhängig vom eingesetzten Substrat, zu verschiedenen reversiblen und irreversiblen Inaktivierungsmechanismen führen könnten. Das in manchen Fällen abweichende Verhalten (mit 0,5 mg/ml BAL) von den zuvor bestimmten Desaktivierungskonstanten (mit 0,02 mg/ml BAL) weist darauf hin, dass die Inaktivierung nicht nur abhängig vom Substrat selbst und dem pH-Wert, sondern auch von dem Enzym-Substrat Verhältnis ist. Weiterhin deuten die Ergebnisse darauf hin, dass sich für die maximale Inaktivierungsrate das Enzym-Substrat Verhältnis für jedes Substrat unterscheidet. Im folgenden Kapitel soll die Inaktivierung in Abhängigkeit vom Enzym-Substrat Verhältnis für Benzaldehyd, 3,5-Dimethoxybenzaldehyd und 4-Chlorbenzaldehyd untersucht werden.

4.2.4 Abhängigkeit der Inaktivierung vom Enzym-Substrat Verhältnis

Zur Überprüfung, ob die Inaktivierungsrate der BAL tatsächlich mit dem Enzym-Substrat Verhältnis korreliert, wurden zunächst die Desaktivierungskonstanten bei konstanter BAL-Konzentration und variabler 4-Chlorbenzaldehyd untersucht. Wobei 0,02 mg/ml BAL mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen von 0,002-20 mM 4-Chlorbenzaldehyd, für eine Stunde bis 7 Tage inkubiert wurden. Anschließend wurde umgekehrt die Enzymkonzentration variiert, während die Substratkonzentration konstant blieb. Ansonsten entsprach die Vorgehensweise den vorangegangenen Experimenten.

In Abb. 62 A ist die Inaktivierung in Abhängigkeit von der eingesetzten Substratkonzentration dargestellt. Bis etwa 1 mM steigt die Geschwindigkeit der Inaktivierung mit

steigender 4-Chlorbenzaldehydkonzentration linear an, eine weitere Konzentrationserhöhung führt zu keiner weiteren Beschleunigung der Inaktivierung. Das Maximum der Inaktivierung liegt hier bei etwa $3\text{--}3,7\% \text{ min}^{-1}$. Mit 20 mM 4-Chlorbenzaldehyd erscheint die Inaktivierung mit $2,5\% \text{ min}^{-1}$ daher relativ gering. Die hohe Abweichung kann zum einen mit der erschwerten Analytik durch die große Menge des ausfallenden Produktes erklärt werden. Zum anderen ist das Reaktionsgleichgewicht mit 20 mM Benzaldehyd durch die Präzipitation des Produktes (4,4'-Dichlorbenzoin) so verschoben, dass in dem Ansatz über den Großteil der Inkubationszeit eine wesentlich geringere 4-Chlorbenzaldehydkonzentration vorliegt. Da das Reaktionsgleichgewicht meist schon in weniger als zwei Minuten spätestens aber nach fünf Minuten erreicht war, ist die tatsächliche Substratkonzentration in allen Inaktivierungsansätzen wesentlich geringer als die ursprünglich eingesetzte. Soweit möglich wurde die Umsetzung des 4-Chlorbenzaldehyds in den Inaktivierungsansätzen ermittelt (10-85%) und die Inaktivierungsrate in Abhängigkeit von der im Inaktivierungsansatz tatsächlich vorhandenen 4-Chlorbenzaldehydkonzentration bestimmt (Abb. 62 B). Ausgehend von dieser Betrachtung steigt die Geschwindigkeit der Inaktivierung mit Erhöhung der 4-Chlorbenzaldehyd Konzentration bis etwa 0,7 mM noch linear an, bei höheren Konzentrationen ist keine weitere Beschleunigung der Inaktivierung zu beobachten. Ein signifikanter Unterschied zu den eingesetzten Substratkonzentrationen ergibt sich also nicht. Die maximale Inaktivierungsrate ist demnach schon bei geringen Konzentrationen von etwa 0,7-1 mM 4-Chlorbenzaldehyd erreicht.

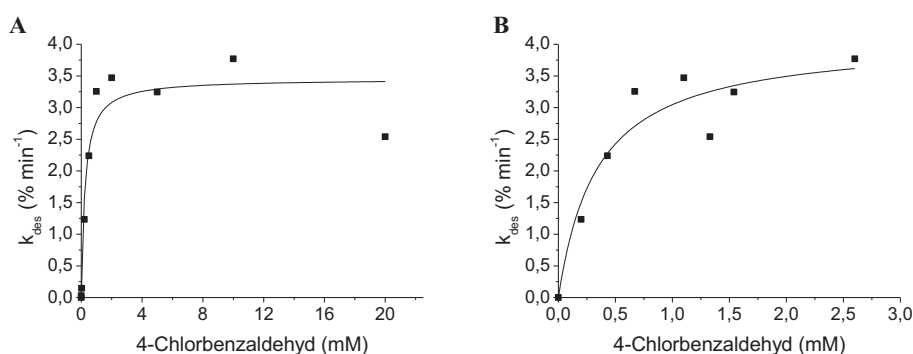


Abb. 62: Inaktivierungsraten der BAL in Abhängigkeit von der eingesetzten 4-Chlorbenzaldehydkonzentration (A) und der 4-Chlorbenzaldehydkonzentration nach Erreichen des Reaktionsgleichgewichts (B). Inaktivierung mit 0-20 mM 4-Chlorbenzaldehyd: 0,02 mg/ml BAL in 50 mM TEA-Puffer, pH 8; 2,5 mM MgSO_4 ; 0,5 mM ThDP; 30 vol% DMSO; $T=25^\circ\text{C}$. Zur besseren Übersicht sind Hilfslinien eingezeichnet.

Wie Kapitel 4.2.3 zu entnehmen ist, entsprach die Inaktivierung der BAL (0,5 mg/ml) mit einer Restaktivität von 27-39% nach zwei Stunden Inkubation mit 2 mM 4-Chlorbenzaldehyd nicht der Erwartung. Die Schlussfolgerung war, dass nicht alleine die Aldehydkonzentration sondern das Verhältnis von Aldehyd zu Enzym für die Inaktivierungsrate von Bedeutung ist. Deshalb wurden nun bei konstanter 4-Chlorbenzaldehydkonzentration variable BAL-Konzentrationen eingesetzt und die Inaktivierungsrate ermittelt (Abb. 63). Tatsächlich konnte mit höheren Enzymkonzentrationen eine verringerte Inaktivierungsrate ermittelt werden. Allerdings ergaben diese Versuche eine maximale Inaktivierung von etwa $5,2\% \text{ min}^{-1}$ bei der geringsten BAL-Konzentration (0,0004 mg/ μl). Diese hohe Inaktivierungsrate könnte auf eine erschwerte Analyse der Aktivität bei der geringen Enzymkonzentration zurückzuführen sein. Zusätzlich könnte die BAL aufgrund der hohen Verdünnungen zur Dissoziation ihrer Tetramere neigen, dies könnte neben der Aldehyd-induzierten Inaktivierung zu einer zusätzlich beschleunigten Inaktivierung führen (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Pohl, IBT2). Bei allen anderen Enzymkonzentrationen liegen die Inaktivierungsraten im Bereich der zuvor durchgeführten Messungen.

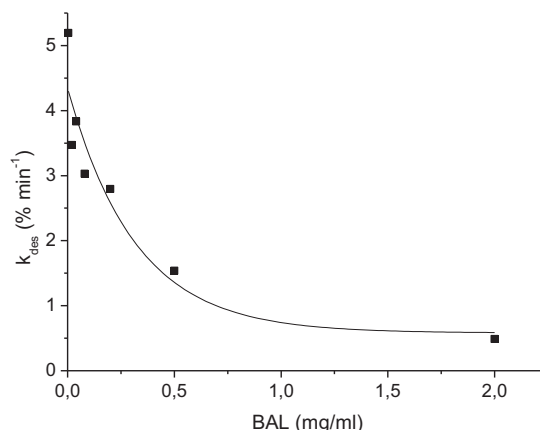


Abb. 63: Inaktivierungsraten der BAL mit 4-Chlorbenzaldehyd in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration. Inaktivierung mit 2 mM 4-Chlorbenzaldehyd: 0,004-2 mg/ml BAL in 50 mM TEA-Puffer, pH 8; 2,5 mM MgSO_4 ; 0,5 mM ThDP; 30 vol% DMSO; $T=25^\circ\text{C}$. Zur besseren Übersicht sind Hilfslinien eingezeichnet.

Das Molekulargewicht der nativen BAL (Tetramer) wurde über Gelfiltrationsanalysen mit 216 kDa ermittelt (Janzen *et al.*, 2006). 1 nmol entsprechen also etwa 216 μg BAL. Bei bekannter Protein- und Substratkonzentrationen, kann unter der Annahme einer reinen Enzymcharge, das molare Verhältnis von Substrat zu Enzym berechnet werden. Zum einen sind die Enzympräparate aber nie vollständig frei von wirtszelleneigenen Proteinen und zum

anderen ist die Proteinbestimmung mittels Bradford nur sehr ungenau. Deshalb ist die Bestimmung des absoluten Substratüberschuss relativ ungenau und kann nur als Anhaltspunkt dienen. Die ermittelten Desaktivierungskonstanten aus den Versuchen mit variabler 4-Chlorbenzaldehyd- (Abb. 62) bzw. BAL-Konzentration (Abb. 63) wurden in Abhängigkeit vom molaren Substratüberschuss aufgetragen und können so direkt miteinander verglichen werden (Abb. 64).

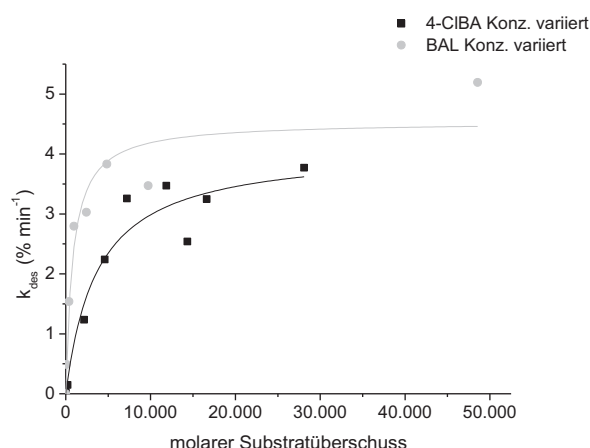


Abb. 64: Inaktivierungsraten der BAL mit 4-Chlorbenzaldehyd in Abhängigkeit vom molaren Aldehydüberschuss. Inaktivierung, siehe Abb. 62 und Abb. 63. Zur besseren Übersicht sind Hilfslinien eingezeichnet.

Die Inaktivierungsraten aus den beiden Experimenten sind zwar nicht deckungsgleich, zeigen im Rahmen der Messungenauigkeit aber doch eine eindeutige Tendenz. Der Vergleich von molarem Aldehydüberschuss zu Enzym zeigt (Abb. 64), dass etwa ein 5.000-10.000 facher 4-Chlorbenzaldehydüberschuss relativ zum Enzym ausreicht, um die maximale Inaktivierung zu erreichen.

Für Benzaldehyd und 3,5-Dimethoxybenzaldehyd wurden entsprechende Analysen nur mit variablen Substratkonzentrationen durchgeführt, da eine Abhängigkeit der Inaktivierungsrate vom Enzym-Substrat-Verhältnis mit 4-Chlorbenzaldehyd eindeutig nachgewiesen werden konnte. Mit Benzaldehyd als Substrat war aufgrund der Präzipitation des Produkts Benzoin eine reproduzierbare Messung nur bis 20 mM möglich. Die ermittelten Umsätze für Benzaldehyd waren gegenüber 4-Chlorbenzaldehyd mit maximal 66% etwas geringer. Zusätzlich war der Umsatz langsamer: mit Benzaldehydkonzentrationen oberhalb von 2 mM war das Reaktionsgleichgewicht erst nach etwa 10-20 min erreicht.

Werden die eingesetzten Benzaldehydkonzentrationen als Referenzwert verwendet, kann eine maximale Inaktivierungsrate von ca. $2,5\% \text{ min}^{-1}$ bei Konzentrationen ab etwa 4 mM erreicht werden (Abb. 65 A). Unter Berücksichtigung der Benzaldehydkonzentrationen nach Einstellung des Reaktionsgleichgewichts ist die maximale Inaktivierungsrate bereits ab etwa 2 mM zu erreichen (Abb. 65 B). Im Rahmen der Messgenauigkeit sind diese Werte nur Näherungen und stellen vermutlich keinen signifikanten Unterschied dar. Werden beide Bezugsgrößen (eingesetzte BA-Konzentration und BA-Konzentration nach Erreichen des Reaktionsgleichgewichts) zur Bestimmung der Inaktivierungsrate herangezogen, kann ein molarer Benzaldehydüberschuss im Bereich von etwa 25.000-50.000 als ausreichend für eine maximale Inaktivierung angesehen werden (Abb. 65 C).

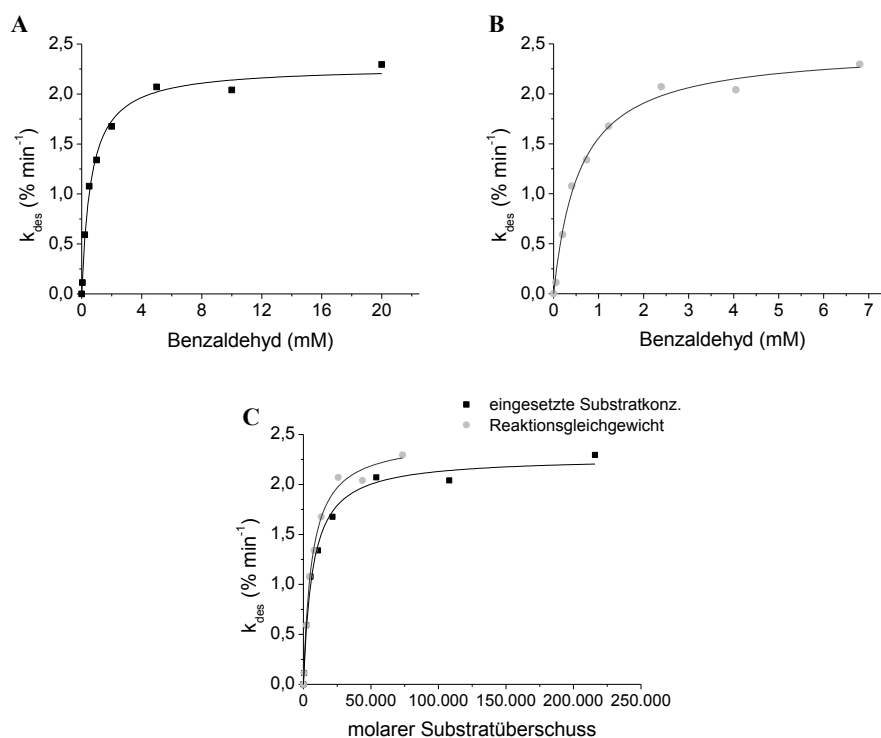


Abb. 65: Inaktivierungsraten der BAL in Abhängigkeit von der eingesetzten Benzaldehydkonzentration (A), der Benzaldehydkonzentration nach Erreichen des Reaktionsgleichgewichts (B) und vom molaren Benzaldehydüberschuss (C). Inaktivierung mit 0-20 mM Benzaldehyd; 0,02 mg/ml BAL in 50 mM TEA-Puffer, pH 8; 2,5 mM MgSO₄; 0,5 mM ThDP; 30 vol% DMSO; T=25 °C. Zur besseren Übersicht sind Hilfslinien eingezeichnet.

Oberhalb von 2 mM 3,5-Dimethoxybenzaldehyd waren keine sinnvollen Messungen möglich, da die ermittelten Inaktivierungsraten bei steigender Substratkonzentration immer geringer

wurden. Eine tatsächliche Verringerung der Inaktivierung mit steigender Aldehydkonzentration erscheint aber sehr unwahrscheinlich und wird auf bisher nicht geklärte Probleme bei der Analytik zurückgeführt. Bei Substratkonzentrationen unterhalb von 0,2 mM konnte der Umsatz nicht ermittelt werden. Da bei einer Substratkonzentration von 0,1 mM bereits die maximale Inaktivierungsrate erreicht wurde, ergibt sich aber kein Unterschied für die Betrachtung der Ergebnisse vor und nach Erreichen des Reaktionsgleichgewichts (Abb. 66 A und B). Ein etwa 2.500-5.000 facher 3,5-Dimethoxybenzaldehydüberschuss relativ zum Enzym reicht aus um die maximale Inaktivierung zu erreichen.

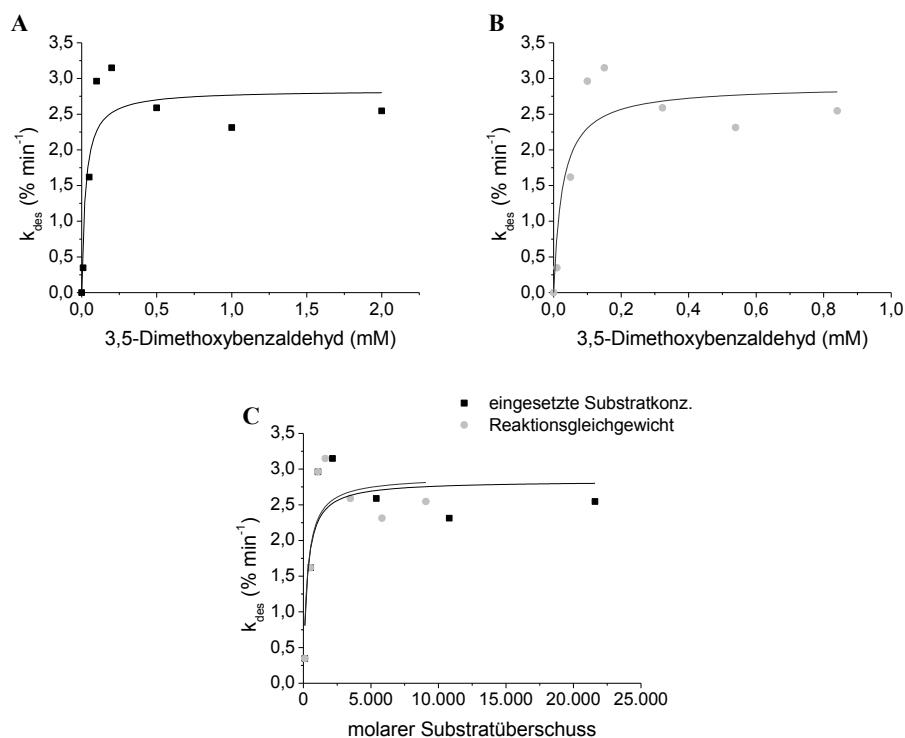


Abb. 66: Inaktivierungsraten der BAL in Abhängigkeit von der eingesetzten 3,5-Dimethoxybenzaldehydkonzentration (A), der 3,5-Dimethoxybenzaldehydkonzentration nach Erreichen des Reaktionsgleichgewichts (B) und vom molaren 3,5-Dimethoxybenzaldehydüberschuss (C). Inaktivierung mit 0-2 mM 3,5-Dimethoxybenzaldehyd: 0,02 mg/ml BAL in 50 mM TEA-Puffer, pH 8; 2,5 mM MgSO₄; 0,5 mM ThDP; 30 vol% DMSO; T=25 °C. Zur besseren Übersicht sind Hilfslinien eingezeichnet.

Fazit: Die Analysen mit 4-Chlorbenzaldehyd haben gezeigt, dass die Inaktivierungsrate nicht allein abhängig von der Substratkonzentration ist, sondern der molare Überschuss des Substrats relativ zum Enzym entscheidend für die Geschwindigkeit der Inaktivierung ist. Bereits geringe Aldehydüberschüsse zwischen 1:2.500 und 1:50.000 reichen aus, um die

maximale Inaktivierungsrate zu erreichen. Wie gering dieser Wert ist, verdeutlicht ein Vergleich mit gelösten DMSO Molekülen im Medium: bei 30 vol% DMSO (ca. 4,22 M) und 20 µg/ml BAL (92,59 nM) beträgt der molare DMSO-Überschuss etwa 1:45 Millionen. Des Weiteren stützen die Ergebnisse die Annahme, dass wenigstens eine Bindestelle mit hoher Affinität für die aromatischen Aldehyde in der BAL vorliegt. Die verschiedenen Inaktivierungsraten mit den diversen Aldehyden könnten dann nicht nur mit unterschiedlichen initialen Inaktivierungsprozessen sondern auch mit unterschiedlichen Bindungsaffinitäten und ihrem speziellen Einfluss auf die Konformationsänderung der BAL erklärt werden.

Die in Abhängigkeit vom Aldehydüberschuss ermittelten Inaktivierungsraten sind jeweils auf ein BAL-Tetramer bezogen. Unter Berücksichtigung, dass die BAL aus vier identischen Untereinheiten (Monomeren) besteht, wird eine mögliche Bindestelle also vermutlich auch viermal pro Enzymmolekül vorliegen. Wäre z.B. eine Schiffbasenbildung über einen spezifischen Lysinrest der BAL an der Inaktivierung beteiligt, liegt dieser Lysinrest vier Mal pro Enzymmolekül vor (Untersuchungen potentieller Reaktionspartner zur Schiffbasenbildung siehe Kapitel 4.3.2). Gleiches gilt für eine Interaktion und Inaktivierung der BAL durch die Aldehyde am aktiven Zentrum. Bezogen auf ein Monomer genügt schon ein Aldehydüberschuss von 1:625 bis 1:12.500, um die maximale Inaktivierungsrate zu erreichen.

4.3 Möglichkeiten zur Stabilisierung der BAL

Für die Stabilisierung eines Enzyms gibt es verschiedene Ansätze, wie z.B. die Immobilisierung, Zusatz von stabilisierenden Komponenten wie Bovines Serum Albumin (BSA), Anpassung der Reaktionsbedingungen (*reaction engineering*) oder Veränderungen in der Primärstruktur mittels Mutagenesen (*enzyme engineering*). Eine Möglichkeit der Stabilisierung unter Prozessbedingungen konnte in der Vergangenheit durch den Einschluss der BAL in Polyvinylalkohol (PVA) Kryogelen erreicht werden. Diese stellen eine Art wässrige Phase für das Enzym dar und wurden für den Einsatz in rein organischen Lösungsmitteln entwickelt. Mit Hexan als organischem Lösungsmittel konnte eine gute Lagerstabilität ohne Aktivitätsverlust über eine Woche bei 4 °C erzielt werden. Überraschend ist aber die hohe Prozessstabilität mit einer Halbwertszeit von 103 Stunden bei guten Produktausbeuten (Hischer *et al.*, 2005). Die intrinsische Substratkonzentration in den PVA-Kügelchen betrug bei diesen Versuchen etwa 5 mM (3-Furaldehyd) und die Synthesen wurden bei 20 °C durchgeführt (Ansorge-Schumacher *et al.*, 2006, Hischer *et al.*, 2005). Die hohe Stabilität der BAL unter Prozessbedingungen im Vergleich zu wässrig-organischen

Zweiphasensystemen, wurde dabei der Abwesenheit von Turbulenzen in der wässrigen Phase und dem minimalen direkten Kontakt der eingeschlossenen BAL mit einer wässrig-organischen Grenzfläche zugesprochen (Ansorge-Schumacher *et al.*, 2006). Aufgrund der bisherigen Ergebnisse in dieser Arbeit erscheint dies als Ursache der Stabilisierung eher unwahrscheinlich. Eher denkbar ist die Blockierung einer Bindeposition der Aldehyde am Enzym durch den Einschluss in die Gelmatrix oder eine geringere Flexibilität des Enzyms, welche größere strukturelle Konformationsänderungen nicht oder nur langsam zulässt. Dass aber auch durch den Einschluss der BAL in der Gelmatrix die Substratinaktivierung immer noch eine Rolle spielt, zeigt der Vergleich der Prozessstabilität bei doppelter Substratkonzentration. Mit einer intrinsischen 3-Furaldehydkonzentration von 10,8 mM in den PVA-Kügelchen, wurde eine fast doppelt so schnelle Inaktivierung beobachtet wie zuvor ($t_{1/2}$: 52 h) (Ansorge-Schumacher *et al.*, 2006). Demgegenüber konnte mittels BSA Zusatz in die wässrige Phase eines Zweiphasensystems oder Senkung der Temperatur, keine entscheidende Stabilisierung der BAL unter Prozessbedingungen erreicht werden (Kühl, 2009).

Mit den bisherigen Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit sind reaktionstechnische sowie enzymtechnische Modifizierungen denkbar, welche auch in Reaktionssystemen mit einer großen wässrigen Phase zu einer Stabilisierung der BAL gegenüber ihren Substraten führen könnten. In den folgenden Kapiteln sollen verschiedene mögliche Inaktivierungshypothesen und Stabilisierungsansätze überprüft werden.

4.3.1 Vergleich von Aktivität und Stabilität der BAL gegenüber aromatischen Aldehyden bei verschiedenen pH-Werten

Generell kann eine Stabilisierung der BAL gegenüber aromatischen Aldehyden bereits durch eine Senkung des Puffer-pH-Werts erreicht werden (Kapitel 4.2.2). So könnte eine Anpassung der Reaktionsbedingungen zur Stabilisierung der BAL unter Prozessbedingungen führen. Da eine Veränderung des pH-Werts aber auch immer Einfluss auf die Aktivität eines Enzyms hat, sollte diese Möglichkeit für die Anwendung überprüft werden. Die Angaben für die spezifische Aktivität der BAL in der Literatur beziehen sich meist auf die Ligase- und Lyasereaktion mit Benzaldehyd. Je nach Bedingungen, Testsystem, Substrat und manchmal auch Enzymcharge können die spezifischen Aktivitäten sowie die kinetischen Parameter variieren (vgl. Kapitel 1.5).

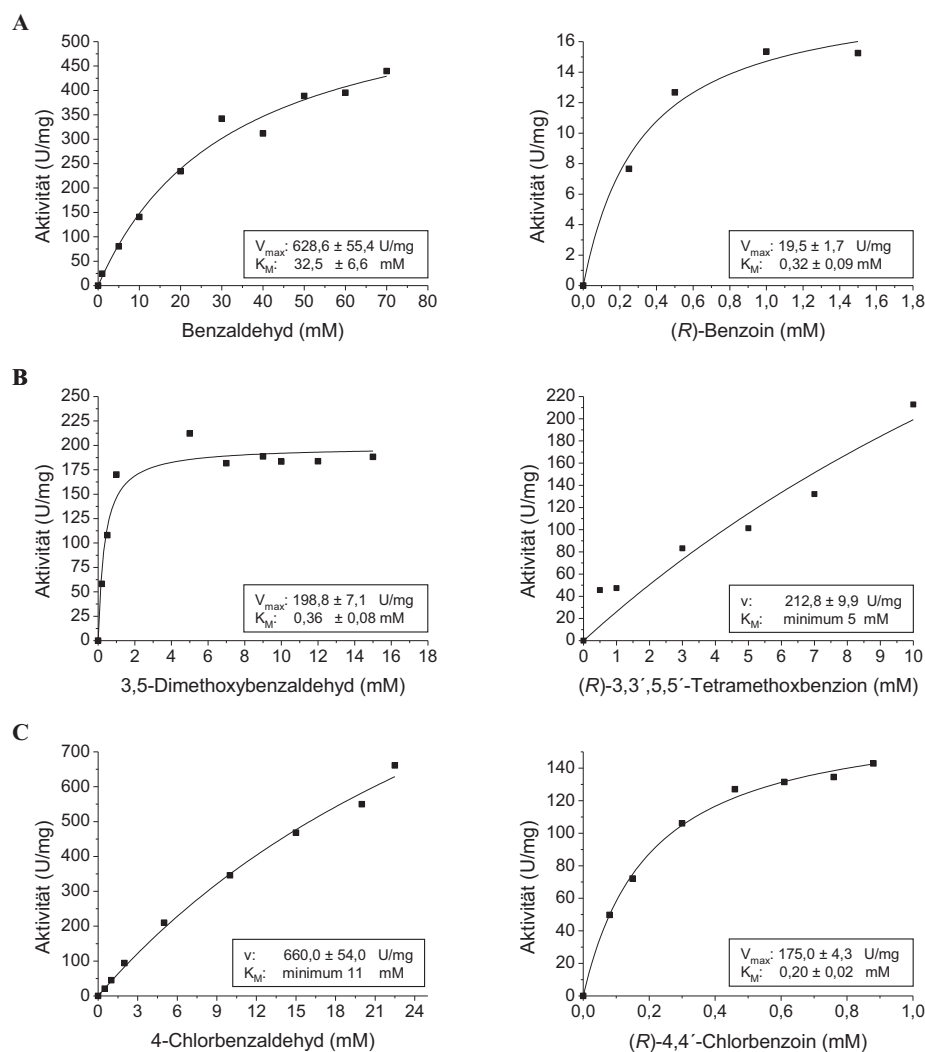


Abb. 67: BAL Kinetiken der Ligase- sowie Lyasereaktion mit Benzaldehyd und (R)-Benzoin (A), 3,5-Dimethoxybenzaldehyd und (R)-3,3',5,5'-Tetramethoxybenzoin (B) (Daten von Carmen Kocot; Kocot, 2010), 4-Chlorbenzaldehyd und 4,4'-Chlorbenzoin (C) (diese Arbeit). 0,67-2 $\mu\text{g/ml}$ BAL in 50 mM TEA-Puffer, pH 8; 0,5 mM ThDP, 2,5 mM MgSO_4 ; 30 vol% DMSO; $T=25^\circ\text{C}$; $n=2$. Die Darstellung erfolgte mittels nicht-linearer Regression unter Verwendung des Programms Origin 8.0. Mit (R)-3,3',5,5'-Tetramethoxybenzoin und 4-Chlorbenzaldehyd konnte innerhalb der Substratlöslichkeit kein Anzeichen für eine Sättigung der BAL gefunden werden. Hier sind die maximalen gemessenen Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten (v) und die Standardabweichungen aus der Doppelbestimmung angegeben. Der minimale K_M , welcher aufgrund der fehlenden Sättigung mindestens vorliegen muss, ist ebenfalls angegeben.

Deshalb wurde die Ligase- und Lyaseaktivität der BAL für die zur vergleichenden Analyse herangezogenen Aldehyde unter den in dieser Arbeit verwendeten Standardbedingungen ermittelt. Die Messungen für Benzaldehyd, Benzoin, 3,5-Dimethoxybenzaldehyd und 3,3',5,5'-Tetramethoxybenzoin wurden von Carmen Kocot im Rahmen ihrer Diplomarbeit

durchgeführt (Kocot, 2010). Die Messdaten wurden, da diese den Bedingungen und der Analytik in der vorliegenden Arbeit genau entsprachen, von Kocot übernommen. Wie erwartet sind die Kurvenverläufe und kinetischen Parameter für jedes Substrat sehr unterschiedlich. Die nach Michaelis-Menten ermittelten Parameter (Kapitel 3.9.3) können der Abb. 67 entnommen werden. Die Kinetiken der Ligaseaktivitäten dienen der Orientierung für die folgenden Vergleiche von Aktivität und Stabilität der BAL gegenüber aromatischen Aldehyden bei verschiedenen pH-Werten. Die kinetischen Analysen der Lyaseaktivitäten wurden zur Vervollständigung eingefügt.

Bisherige Analysen zur Bestimmung des optimalen pH-Werts, hinsichtlich der Stabilität der BAL, waren auf die Lagerstabilität begrenzt und liegen etwa bei pH 7. Oberhalb von pH 8 nimmt die Stabilität der BAL rapide ab (Janzen *et al.*, 2006, Stillger *et al.*, 2006). Die ermittelten Optima für die Ligaseaktivität variieren zwischen pH 8-9,5 (Domínguez de María *et al.*, 2006, Janzen *et al.*, 2006, Kokova, 2009, Schmidt *et al.*, 2009, Stillger *et al.*, 2006), weshalb die meisten Reaktionen bei pH-Werten zwischen 7,5 und 8 durchgeführt werden. Die pH-abhängige Stabilität und der entsprechenden pH-abhängigen Aktivität in Gegenwart der Aldehyde wurde bisher nicht untersucht. Da die Stabilität der BAL gegenüber den aromatischen Aldehyden eine signifikante pH-Abhängigkeit aufweist (Kapitel 4.2.2), könnte eine Anpassung des pH-Werts unter Prozessbedingungen notwendig sein. Ein Vergleich der Stabilität und Aktivität unter Prozessbedingungen bei verschiedenen pH-Werten sollte zeigen, ob eine Optimierung des Reaktionsprozesses durch Senkung des pH-Werts möglich sein könnte (Abb. 68).

Entsprechend der Arbeit von Stillger (Stillger *et al.*, 2006), hat die BAL gegenüber Benzaldehyd bei pH 6-6,5 keine nachweisbare Ligaseaktivität (Abb. 68 A). Daher wurde die Stabilität der BAL gegenüber Benzaldehyd nur bei pH 7-9 überprüft. Zwar kann bei Inkubation der BAL mit Benzaldehyd bei pH 7 gegenüber pH 8 eine Stabilisierung um etwa das 2,5-Fache erreicht werden, wobei jedoch die Aktivität um das 8-Fache sinkt. Eine Senkung des pH-Werts würde vermutlich für die Benzoin synthese ausgehend von Benzaldehyd nicht zu einer Optimierung des Reaktionsprozesses führen.

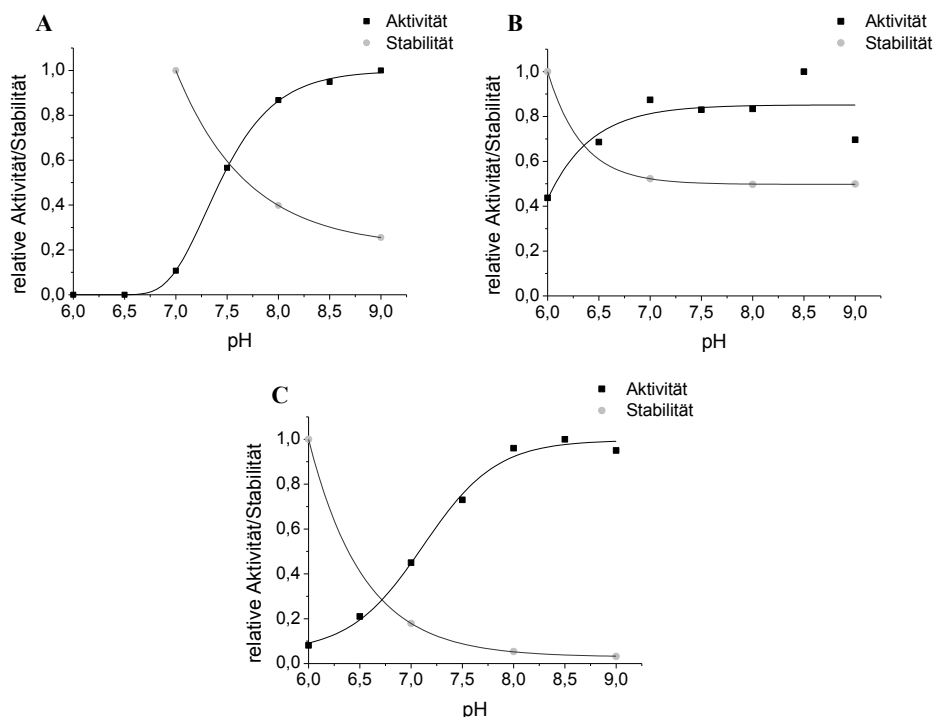


Abb. 68: Gegenüberstellung der relativen Aktivität und Stabilität der BAL gegenüber Benzaldehyd (A), 3,5-Dimethoxybenzaldehyd (B) und 4-Chlorbenzaldehyd (C). Die relative Stabilität wurde über die in Kapitel 4.2.2 bestimmten Halbwertszeiten ermittelt. Relative Aktivität mit 1,7 µg/ml (A) bzw. 3,3 µg/ml (B,C) BAL in 50 mM TEA-Puffer, pH 6-9; 2,5 mM MgSO₄; 0,5 mM ThDP; 30 vol% DMSO; T=25 °C und 50 mM Benzaldehyd (A), 10 mM 3,5-Dimethoxybenzaldehyd (B) oder 15 mM 4-Chlorbenzaldehyd (C). Die Reaktion wurde jeweils nach 2 min gestoppt. Zur besseren Übersicht, sind Hilfslinien eingezeichnet.

Das pH-Spektrum, in dem die BAL eine vergleichbare Ligaseaktivität für 3,5-Dimethoxybenzaldehyd besitzt, ist unerwartet groß (Abb. 68 B) verglichen mit den pH-Profilen für 3,5-Dimethoxybenzaldehyd (Kapitel 1.5.1; Schmidt *et al.*, 2009). Schmidt verwendete allerdings eine relativ geringe Magnesiumionenkonzentration (0,25 mM Mg²⁺). Wie in Kapitel 4.1.5 besprochen, zeigt die BAL bei Magnesiumkonzentrationen unterhalb von 1 mM mit 3,5-Dimethoxybenzaldehyd eine verringerte Ligaseaktivität. Da die Stabilisierung der Substrate sowie der Kofaktoren im aktiven Zentrum ebenfalls pH-abhängig ist, könnte das veränderte pH-Profil auf die höhere Magnesiumionenkonzentration zurückzuführen sein. Des Weiteren könnten die Unterschiede durch die verschiedenen Testsysteme begründet sein. Jedenfalls kann bei pH 6 eine Stabilisierung um etwa das Doppelte gegenüber pH 8 erreicht werden, wobei die Aktivität um etwa 55% sinkt. Eine Optimierung des Prozess durch Senkung des pH ist auch im Falle der Umsetzung von 3,5-Dimethoxybenzaldehyd zu 3,3',5,5'-Tetramethoxybenzoin unwahrscheinlich.

Für die Ligaseaktivität der BAL mit 4-Chlorbenzaldehyd wurde ein Optimum der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit bei etwa pH 8,5 ermittelt (Abb. 68 C). In diesem Bereich besitzt sie aber auch die geringste Stabilität gegenüber dem Substrat. Aber bei pH 7 besitzt die BAL noch eine relative Aktivität von 45%, wobei die Halbwertszeit um ein 3,5-4 Faches erhöht ist. Mit pH 6 kann nur eine relative Aktivität von 8,1% erreicht werden, dies entspricht etwa einer Minderung um das 12-Fache. Demgegenüber ist die Lebensdauer bei pH 8 um etwa den Faktor 20 höher (Kapitel 4.2.2). Eine Optimierung der Reaktion mit 4-Chlorbenzaldehyd durch Senkung des pH könnte demnach möglich sein.

Zur Überprüfung ob durch die Senkung des pH-Werts, mit 4-Chlorbenzaldehyd als Substrat, tatsächlich eine Prozessoptimierung erreicht werden kann, die zu einer Minderung des Enzymverbrauches führt, sollten die Reaktionsverläufe bei verschiedenen pH-Werten verfolgt werden. Zunächst sollte eine geeignete BAL-Konzentration ermittelt werden, bei welcher der Reaktionsverlauf gut nachvollzogen werden kann und ein Großteil des Inaktivierungsprozesses vor Erreichen des Reaktionsgleichgewichtes stattgefunden hat.

Mit 20 µg/ml BAL konnte in den Inaktivierungsansätzen bis 20 mM 4-Chlorbenzaldehyd das Reaktionsgleichgewicht innerhalb von 5 min erreicht werden (Kapitel 4.2.4). Ausgehend von diesen Daten wurden nun entsprechend Reaktionsansätze mit 20 µg/ml und absteigenden BAL-Konzentrationen mit 20 mM 4-Chlorbenzaldehyd bei pH 8 untersucht. Das Enzym-Substrat-Verhältnis von 1:10.000, bei dem mit 4-Chlorbenzaldehyd die maximale Inaktivierungsrate erreicht ist, wird so in keinem Fall unterschritten. Nach Abstoppen der Reaktion zu distinkten Zeitpunkten wurde der Umsatz mittels HPLC-Analytik ermittelt. Die beobachteten Reaktionsverläufe ergeben sich zwangsläufig aus der Reaktionsgeschwindigkeit und der Inaktivierung der BAL mit 4-Chlorbenzaldehyd, wobei durch die erhöhte Substratkonzentration keine erhöhte Inaktivierungsrate zu erwarten war (siehe Kapitel 4.2.4). Mit 20 µg/ml BAL konnte ein maximaler Umsatz von etwa 85% in 6 Minuten erreicht werden (Abb. 69). Bei Verringerung der BAL-Konzentration ist der Umsatz natürlich langsamer und bereits mit 2 µg/ml wird das Reaktionsgleichgewicht bei 85% Umsatz bei 15-fach längerer Inkubation (90 min) nicht mehr erreicht.

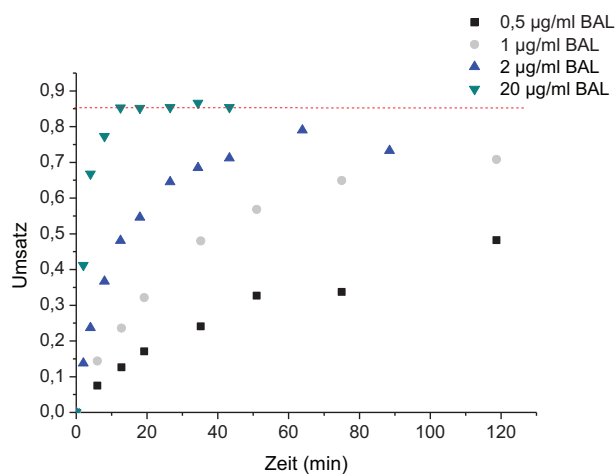


Abb. 69: Reaktionsverläufe mit 20 mM 4-Chlorbenzaldehyd und variablen BAL-Konzentrationen. 50 mM TEA-Puffer, pH 8; 2,5 mM MgSO_4 ; 0,5 mM ThDP; 30 vol% DMSO; 20 mM 4-Chlorbenzaldehyd; $T=25^\circ\text{C}$. Der maximale Umsatz (Reaktionsgleichgewicht) von 85% ist durch die gestrichelte Linie markiert.

Da die Halbwertszeit der BAL gegenüber 4-Chlorbenzaldehyd bei pH 8 etwa 20 min beträgt (Kapitel 4.2.2), sollte die Inaktivierung innerhalb dieser Zeit einen so entscheidenden Einfluss auf die BAL nehmen, dass eine Verbesserung des Reaktionsprozesses durch Absenkung des pH-Werts auf pH 7 (3,5-4-fache Stabilisierung, ca. 45% der Aktivität gegenüber pH 8) in einem angemessenen Reaktionszeitraum ermittelt werden kann.

Dementsprechend wurden Reaktionsansätze mit 20 mM 4-Chlorbenzaldehyd und 2 µg/ml BAL in 50 mM TEA-Puffer mit pH-Werten von pH 6-9 erstellt, in 50 µl Aliquots aufgeteilt und die Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten gestoppt. Die ermittelten Umsätze sind in Abb. 70 dargestellt. Mit der gewählten BAL-Konzentration konnte das Reaktionsgleichgewicht von 85% innerhalb von 100 min bei keinem pH-Wert erreicht werden. Die Inaktivierung durch das Substrat wirkt also in allen Fällen limitierend auf die Reaktion. Während die Reaktionsverläufe mit pH 8 und pH 9 beinahe identisch sind und nach etwa 50 Minuten ein Umsatz von über 70% erreicht werden kann, wird dieser Wert nicht einmal ansatzweise bei pH 7 innerhalb der doppelten Zeit erreicht. Aufgrund der verminderten Inaktivierung der BAL bei pH 7 ($t_{1/2} = \text{ca. } 70 \text{ min}$) wurde vermutet, dass der Reaktionsverlauf bei pH 7 zunächst langsamer verläuft, dafür aber länger linear ansteigt und der maximal mögliche Umsatz von 85%, im Gegensatz zu der Reaktion bei pH 8 oder 9, erreicht wird. Mit pH 6 kann innerhalb von knapp 100 Minuten kaum ein Umsatz von 5% erreicht werden

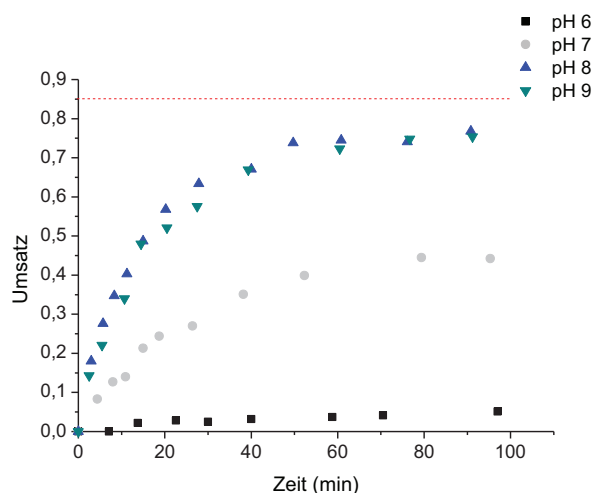


Abb. 70: Reaktionsverläufe mit 20 mM 4-Chlorbenzaldehyd und variablen pH-Werten. 2 µg/ml BAL in 50 mM TEA-Puffer, pH 6-9; 2,5 mM MgSO₄; 0,5 mM ThDP; 30 vol% DMSO; 20 mM 4-Chlorbenzaldehyd; T=25 °C. Der mögliche maximale Umsatz von 85% ist durch die gestrichelte Linie markiert.

Da der pH das thermodynamische Gleichgewicht an sich nicht beeinflusst (vgl. Schmidt, 2008), kann davon ausgegangen werden, dass die Reaktionsrate bei pH 7 noch zu gering ist, um die durch das Substrat hervorgerufene Inaktivierung zu kompensieren. Demgegenüber kann die BAL bei pH 8 und pH 9 trotz der erhöhten Inaktivierungsrate, eine hohe Aktivität aufrechterhalten, so dass ein vergleichsweise schneller Umsatz möglich ist. Während des Reaktionsverlaufs nimmt die Substratkonzentration stetig ab. Da im löslichen Bereich von 4-Chlorbenzaldehyd keine Substratsättigung der BAL vorliegt, sinkt auch die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit sofort (vgl. Abb. 67 C). Inwieweit die Reaktionsrate bei pH 7 abhängig von der Substratkonzentration sinkt, kann nicht sicher vorausgesagt werden.

Fazit: Wie sich gezeigt hat, sind Aktivitäten und Stabilitäten der BAL sehr variabel für die unterschiedlichen Substrate und Bedingungen, so dass eine Optimierung für andere Substrate zwar unwahrscheinlich ist, aber nicht ausgeschlossen werden kann. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist die Voraussage von Reaktionsprozessen anhand weniger Parameter sehr schwierig. Eine Überprüfung der Reaktionsverläufe bei verschiedenen pH-Werten und Enzymkonzentrationen kann aber in jedem Fall, für Synthesen im großen Maßstab, dringend empfohlen werden. So kann ein ausreichend schneller und maximaler Umsatz ohne einen unwirtschaftlichen Einsatz des Enzyms erreicht werden (vgl. Schmidt, 2008). Computergestützte Modellsysteme wie von z.B. von Schmidt und Zavrel können bei der Wahl der Reaktionsparameter helfen und so die Zahl der notwendigen Experimente reduzieren. Auf

diese Weise kann Zeit und Material eingespart werden und Entwicklungsprozesse effizienter gestaltet werden (Schmidt, 2008, Zavrel, 2009).

4.3.2 Hypothese: Inaktivierung durch Schiffbasenbildung

Alle bisherigen Ergebnisse deuten auf wenigstens eine Position im Enzym hin, an der die aromatischen Aldehyde binden können und somit zur Einschränkung oder Verlust der Aktivität führen. Des Weiteren deuten die verbesserten Stabilitäten bei Senkung des pH und die hohe Reaktivierbarkeit auf die Bildung von Schiffbasen hin, welche über einen nukleophilen Angriff freier Aminogruppen an die Carbonylgruppe des Aldehyds entstehen (Abb. 59). Theoretisch sind für eine solche Schiffbasenbildung 12 Positionen denkbar, neben dem N-Terminus sind in der BAL 11 Lysinreste pro Untereinheit enthalten.

4.3.2.1 Vergleichende Analyse der Lysinreste in BAL und BFD

Bei Stabilitätsuntersuchungen der Benzoylformiatdecarboxylase-Variante *BFDH281A*, welche der BAL strukturell sehr ähnlich ist, konnte bei Inkubation über mehrere Tage keine Inaktivierung beobachtet werden (Kapitel 4.1.7). Da BFD und BAL eine Vielzahl von Lysinresten an der Enzymoberfläche, also lösungsmittelzugänglich, enthalten (BFD: 11; BAL: 10 oberflächenexponierte Lysinreste pro Monomer), liegt die Vermutung nahe, dass diese Lysine auch bei der BAL nicht nennenswert zur Inaktivierung beitragen (Abb. 71).

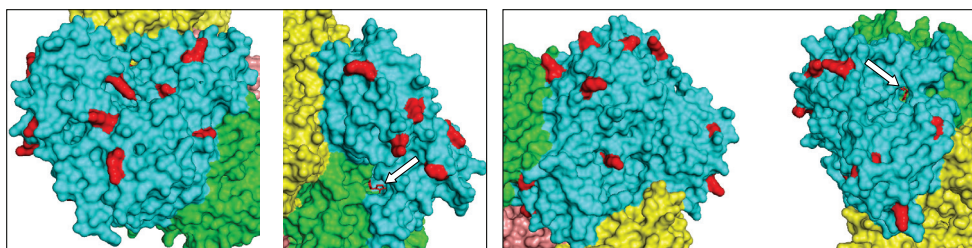


Abb. 71: Oberflächendarstellung der 3D-Struktur der BAL (links: PDB 2AG0) und der BFD (rechts: PDB 2v3w). Die einzelnen Monomere der BAL sowie der BFD sind in blau, gelb, grün und rosa dargestellt. Die oberflächenlokalisierten Lysinreste für jeweils ein Monomer sind rot markiert. Ebenfalls in rot ist der im aktiven Zentrum lokalisierte Kofaktor ThDP dargestellt (zusätzlich durch einen Pfeil markiert). Die Abbildungen wurden mit dem Programm PyMOL erstellt.

Keiner der Lysinreste liegt unmittelbar in oder an den aktiven Zentren, weder in der BAL noch in der BFD. Die Ausbildung von Schiffbasen mit Lysinresten, welche nur zu geringen Konformationsänderungen am aktiven Zentrum führen, können demnach ausgeschlossen

werden. Dies machte eine weitergehende Analyse der Lysinreste der BAL notwendig um potentielle Bindungspartner zu identifizieren. Die durchschnittlichen pK_S -Werte der ϵ -Aminogruppen von Lysinen liegen zwischen 9-9,5 (Hermanson, 1995), durch die Mikroumgebung im Protein können die genauen pK_S -Werte für die einzelnen Aminosäurereste jedoch variieren (Eyzaguirre, 1996). Berechnungen mit dem Internetprogramm PROPKA 2.0 anhand der 3D-Struktur der BAL, ergaben für die oberflächenlokalisierten Lysinreste einen pK_S -Wert von > 9 . Diese liegen somit bei einem Puffer-pH von 8 vorwiegend protoniert und somit unreaktiv vor (Tabelle 14).

Tabelle 14: pK_S -Werte aller 11 Lysinreste eines Monomers der BAL (Berechnung mit PROPKA 2.0).

Lysinposition:	16	66	127	203	221	265	348	363	381	408	464
pK_S :	10,08	10,38	6,93	10,43	9,31	10,50	10,43	10,08	10,36	10,29	9,64

Bei der PROPKA Berechnung der pK_S -Werte fällt auf, dass ein eigentlich im Zentrum des Enzyms liegender Lysinrest, das Lysin an Position 127 (Lys127) (Abb. 72 B) einen niedrigeren pK_S von etwa 6,9 besitzt. Bei einem Puffer-pH von 8 sollte die ϵ -Aminogruppe des Lys127 überwiegend deprotoniert vorliegen, was die Wahrscheinlichkeit der Bildung von Schiffbasen erhöht. Während bei pH 6 der Anteil protonierter ϵ -Aminogruppen überwiegt und so die Schiffbasenbildung unwahrscheinlicher wird.

Die Lys127 aller vier Ketten sind in der Nähe der Kontaktflächen der Monomere angeordnet und stehen sich genau gegenüber (Abb. 72 C). Eine Anlagerung der Aldehyde an dieser Position könnte zu entscheidenden strukturellen Veränderungen führen, welche die Inaktivierung der BAL durch die Aldehyde erklären könnte. Zwar ist auch in der BFD ein Lysinrest pro Monomer im Zentrum der BFD (Lysin 124) an den Kontaktflächen der einzelnen Monomere orientiert (Abb. 72 A) und besitzt einen ähnlichen pK_S wie Lys127 der BAL, wenn jedoch die veröffentlichte Kristallstruktur die tatsächliche Situation in wässriger Lösung darstellt, ist dieses Lysin nicht zugänglich für das Lösungsmittel und kann daher von den aromatischen Aldehyden nicht erreicht werden. Die BAL ist laut der Kristalldaten an den Kontaktflächen nicht so kompakt wie die BFD und es scheint eine Öffnung im Zentrum der BAL zu geben (vgl. Abb. 72 A und B). Lys127 ist somit theoretisch Lösungsmittel- und damit auch für die Aldehyde zugänglich.

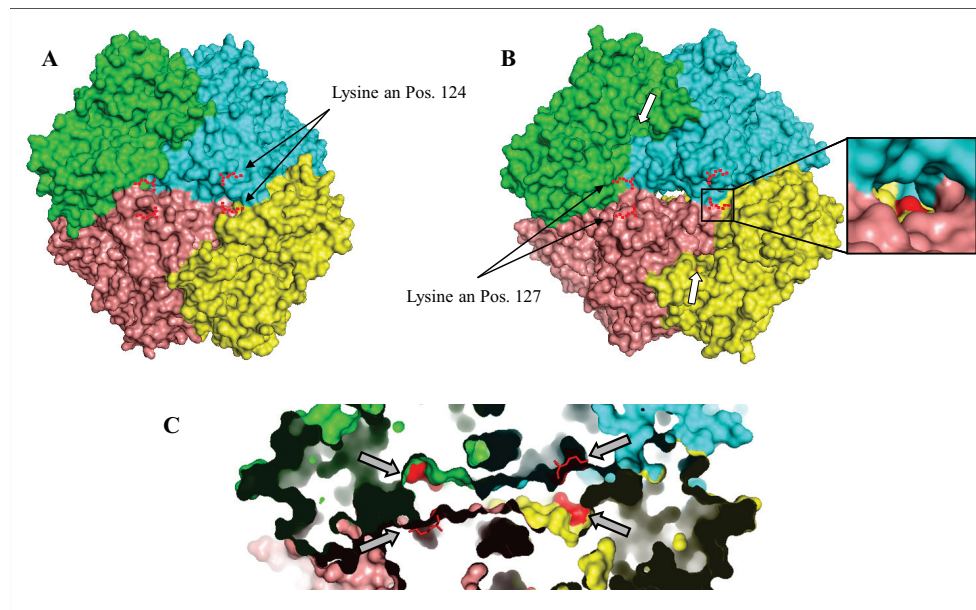


Abb. 72: Oberflächendarstellung der BFD (A) und der BAL (B) sowie ein Querschnitt durch die BAL zur Ermittlung der relativen Position von Lys127 der einzelnen Monomere zueinander (C). Die einzelnen Monomere der BAL sowie der BFD sind in blau, gelb, grün und rosa dargestellt. Die im Zentrum der Enzyme liegenden Lysinreste an Position 124 der BFD und an Position 127 der BAL sind rot markiert. Aufgrund der weniger kompakten Struktur an den Kontaktflächen der vier Monomere in der BAL, ist das Lys127 in der BAL theoretisch Lösungsmittel zugänglich (vergrößert in B dargestellt, Lys127 in rot). Die Zugänge zu zwei aktiven Zentren der BAL sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet (B). Die anderen beiden aktiven Zentren liegen diesen genau gegenüber. Im Querschnitt der BAL (C) sind zusätzlich zur Oberflächendarstellung die Strukturen der Lys127 erkennbar und durch graue Pfeile hervorgehoben. BFD: PDB 2v3w; BAL: PDB 2AG0. Die Abbildungen wurden mit dem Programm PyMOL erstellt.

Versuche zur chemischen Modifikation der BAL über eine Acetylierung der Aminogruppen von Lysinen mit zyklischen Anhydriden zeigten eine hohe Inaktivierung der BAL von etwa 70-99%. Während die chemische Modifikation der ϵ -Aminogruppen mit sterisch sehr anspruchsvollen Polyethylenglycol-Derivaten (mPEG₇₅₀ oder mPEG₂₀₀₀) zu keinem Aktivitätsverlust führte (van den Wittenboer, 2009). Aufgrund des geringen Molekulargewichts der Anhydride sind auch Aminosäurereste zugänglich, die nicht direkt an der Oberfläche exponiert vorliegen, wohingegen mPEG nur mit Aminosäureresten an der Enzymoberfläche reagieren kann (Abb. 73) (van den Wittenboer, 2009). Die verwendeten Anhydride entsprechen hinsichtlich ihres Molekulargewichts ungefähr den aromatischen Aldehyden, so dass Enzymbereiche, welche den Anhydriden zugänglich sind, sterisch auch für die Benzaldehydmoleküle erreichbar sein sollten (Abb. 73). Diese Beobachtungen unterstützen die Vermutung, dass Lys127 ein möglicher Angriffspunkt für die aromatischen

Aldehyde darstellt und eine Reaktion an dieser Position zur Inaktivierung der BAL beitragen kann.

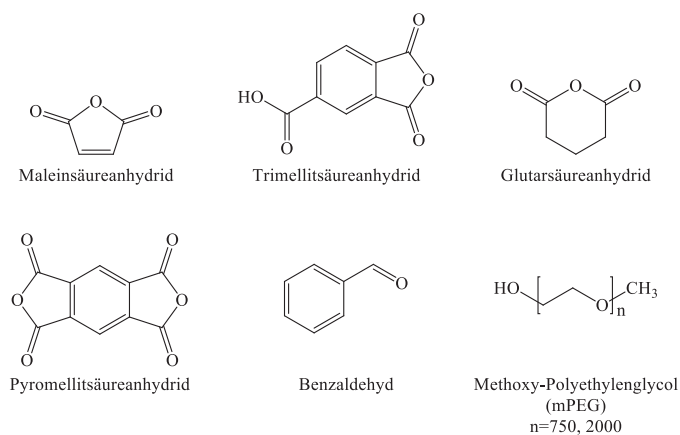


Abb. 73: Zur Modifikation verwendete Anhydride und mPEG-Derivate (van den Wittenboer, 2009) mit Benzaldehyd im Vergleich.

Ob die beobachtete Inaktivierung der BAL durch eine Schiffbasenbildung am Lys127 hervorgerufen werden könnte, sollte durch den Austausch zu anderen Aminosäuren, mittels gezielter Mutagenese überprüft werden.

4.3.2.2 BAL-Varianten zur Überprüfung der Schiffbasen-Hypothese

Anhand der 3D-Struktur wurden mögliche Aminosäuren identifiziert, gegen welche das Lys127, unter Berücksichtigung von sterischen Aspekten, polaren Wechselwirkungen usw., ausgetauscht werden kann. Wenn eine Schiffbasenbildung am Lys127 mit den Aldehyden tatsächlich zu einer Inaktivierung der BAL führt, könnte auch ein Aminosäureaustausch an dieser Stelle inaktivierend wirken. Aus diesem Grund wurden acht Varianten geplant. Und zwar sollte Lys127 gegen die Aminosäuren Alanin, Arginin, Asparagin, Glutamat, Glutamin, Isoleucin, Leucin und Methionin getauscht werden. Die gewünschten Mutationen wurden bei Sloning Biotechnologie mit Sitz in München in Auftrag und wie in Kapitel 3.3.6 beschrieben behandelt. Die Varianten wurden zunächst in kleinen Maßstab (10 ml) überexprimiert (Kapitel 3.4.5 und 3.3.3). Nach Zellaufschluss wurde mittels eines kolorimetrischen Tests (Kapitel 3.9.4) oder des Fluoreszenz basierten Tests (Kapitel 3.9.1.3.2) eine Ligaseaktivität der Varianten im Rohextrakt nachgewiesen. Für alle Varianten konnte eine Ligaseaktivität bestätigt werden.

Drei Varianten wurden zur Ermittlung der Inaktivierung gegenüber den Standardaldehyden (Benzaldehyd, 3,5-Dimethoxybenzaldehyd und 4-Chlorbenzaldehyd) ausgewählt, im 5 Liter Maßstab überexprimiert (Kapitel 3.3.3) und über Ni-NTA²⁺ gereinigt (Kapitel 3.6). Die ermittelten Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten der BALLys127 Varianten gegenüber den Standardaldehyden stimmen mit denen der Wildtyp BAL überein.

Daher wurden die Inaktivierungsraten entsprechend den Versuchen mit der Wildtyp BAL ermittelt (Kapitel 3.10.3) und miteinander verglichen (Abb. 74). Keine der untersuchten Varianten zeigte im Vergleich zur Wildtyp BAL einen Unterschied in der Inaktivierung durch die untersuchten Aldehyde. Eine Schiffbasenbildung an den Lysinresten der BAL kann also als äußerst unwahrscheinlich angesehen werden.

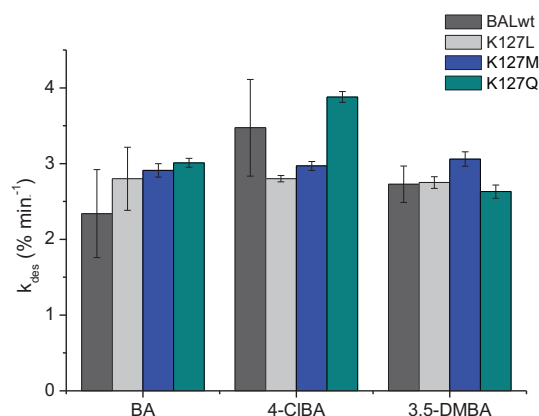


Abb. 74: Inaktivierungsraten der BALLys127-Varianten mit Benzaldehyd, 4-Chlorbenzaldehyd und 3,5-Dimethoxybenzaldehyd. Inaktivierungsansatz: 20 µg/ml BAL in 50 mM TEA-Puffer, pH 8; 0,5 mM ThDP, 2,5 mM MgSO₄; 30 vol% DMSO; 2 mM Substrat; T=25 °C. wt: Wildtyp, K: Lysin, L: Leucin, M: Methionin, Q: Glutamin. Die Standardabweichungen der Wildtyp BAL beziehen sich auf die empirisch ermittelten Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die anderen Standardabweichungen ergeben sich aus der Berechnung von k_{des} eines Experiments und stellen keine empirisch ermittelten Standardabweichungen dar.

Für aliphatische Aldehyde konnten kovalente Modifikation auch mit anderen Aminosäureresten als Lysin sowie intra- und intermolekulare *crosslinks* nachgewiesen werden (Buko *et al.*, 1999, Metz *et al.*, 2004, Uchida *et al.*, 1998). Nach aktuellem Kenntnisstand werden in der Literatur nur detaillierte Inaktivierungs- und Stabilisierungsanalysen gegenüber aliphatischen Aldehyden beschrieben. Hier führten vor allem Austausch anderer Aminosäuren als Lysin zu einer Stabilisierung der Enzyme (Di Lorenzo *et al.*, 2007, Jennewein *et al.*, 2006). Eine Interaktion anderer Aminosäurereste mit den aromatischen

Aldehyden, ist aber aufgrund der geringen Nukleophilie kaum wahrscheinlich (persönliche Mitteilung: Apl. Prof. Dr. Martina Pohl, IBT2). Eine relevante Inaktivierung über eine kovalente Bindung der Benzaldehyde an die BAL ist daher äußerst unwahrscheinlich. Alle bisherigen Ergebnisse weisen aber auf eine pH-abhängige, reversible Interaktion der Benzaldehyd-Derivate mit der BAL hin. Vermutlich führen andere Wechselwirkungen (z.B. hydrophobe oder ionische) zu einer initialen Inaktivierung der BAL und anschließend zu einer nicht oder nur teilweise reversiblen Konformationsänderung.

4.3.3 Überprüfung von strukturell der BFD angeglichenen BAL-Varianten

Da die *BFDH281A* gegenüber den aromatischen Aldehyden keine nachweisbare Sensitivität in einem Zeitraum von 4-5 Tagen zeigt, sollte auch die Stabilität von, der BFD-Struktur angeglichenen, BAL-Varianten gegenüber den aromatischen Aldehyden überprüft werden.

4.3.3.1 Planung und Charakterisierung von BFD ähnlichen BAL Varianten

Im Rahmen ihrer Diplomarbeit wurden von Carmen Kocot die Struktur-Funktionsbeziehungen der *BFDH281A* und der BAL hinsichtlich ihrer Aktivität und Stabilität gegenüber aromatischen Aldehyden untersucht (Kocot, 2010). Für die BAL wurde im Gegensatz zur *BFDH281A* die Produktfreisetzung aus dem aktiven Zentrum als geschwindigkeitslimitierender Reaktionsschritt beschrieben (Kokova *et al.*, 2009).

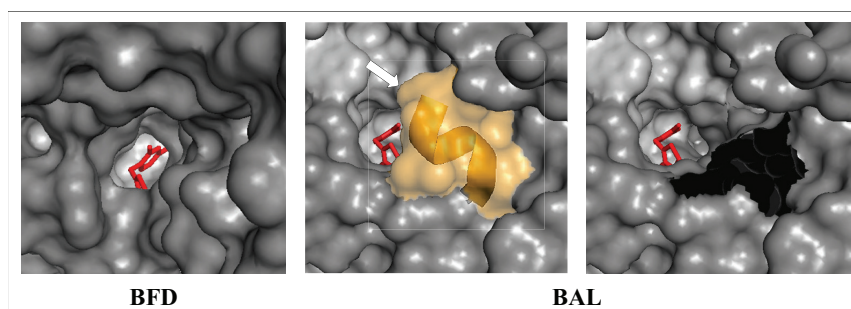


Abb. 75: Oberflächendarstellung der Röntgenkristallstruktur und Vergleich der Substratkanäle der BFD (PDB: 2w3v, links) sowie der BAL (PDB: 2AG0, mitte) und einem Modell bei dem der C-Terminus entfernt wurde (rechts). Die Monomere sind in dunkel- und hellgrau, das im aktiven Zentrum lokalisierte ThDP ist rot dargestellt. Die C-terminale α -Helix (AS 551-555) der BAL ist in orange markiert und die helikale Struktur angedeutet (mitte). Eine Untereinheit der BAL besteht aus 563 AS, die Auflösung der Röntgenstruktur war aber nur bis 555 AS möglich. Die Aminosäurereste 556 (die Position ist durch einen weißen Pfeil markiert) bis 563 bilden eine flexible Struktur aus, welche röntgenkristallographisch nicht aufgelöst werden kann (Mosbacher *et al.*, 2005). Durch Entfernung des C-Terminus (ab AS 551) wird der Zugang zum aktiven Zentrum der BAL erweitert (rechts). Die Abbildungen wurden mit dem Programm PyMOL erstellt

Als Ursache der erschwerten Produktfreisetzung wird eine α -Helix im C-terminalen Bereich der BAL diskutiert, welche zu einer Verengung des Substratkanals führen kann. Dies setzt allerdings voraus, dass die Struktur dieses Bereichs in Lösung der im Kristall entspricht. Da die *BFDH281A* im Vergleich zur BAL um 35 Aminosäurereste verkürzt ist, fehlt dieser Bereich in der BFD (Abb. 75 und Kapitel 1.4.4.3). In ihrer Arbeit entwickelte Kocot BAL Varianten mit verkürztem C-Terminus, die somit der *BFDH281A* strukturell noch ähnlicher waren (Kocot, 2010).

Wie in Abb. 76 schematisch dargestellt, wurde bei der *HisBAL Δ* Variante die C-terminale α -Helix sowie der C-terminal fusionierte Hexahistidin Tag (His_6) (in der Kristallstruktur nicht erkennbar) entfernt. Dafür wurde für die Reinigung über Ni^{2+} -NTA Agarose ein N-terminaler His-Tag eingefügt. So sollte eine Blockierung des Substratkanals vermieden und der Einfluss des gesamten C-Terminus auf die Aktivität sowie Stabilität untersucht werden. Zusätzlich wurde zwischen dem His-Tag und der BAL-kodierenden Sequenz, die Erkennungssequenz für die FaktorXa-Protease eingefügt, so kann der His-Tag nach Reinigung des Enzyms entfernt werden, wenn gewünscht.

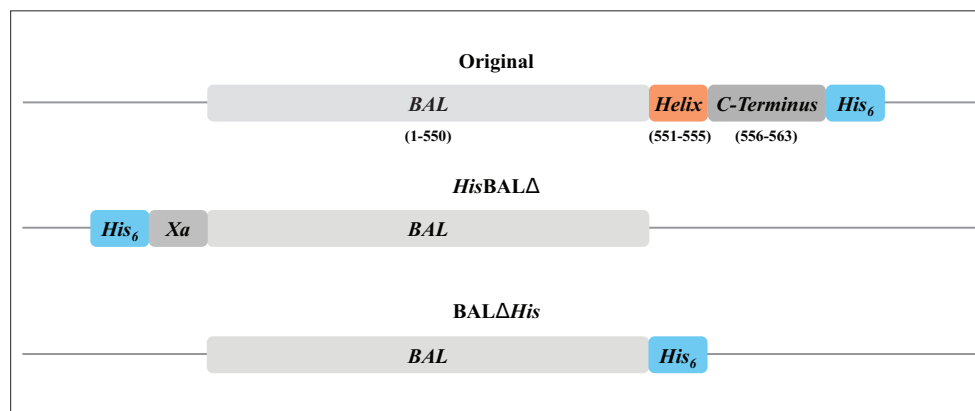


Abb. 76: Schematische Darstellung der verwendeten BAL-Sequenz sowie der Deletionsvarianten (nach Kocot, 2010). In diesem Schema wurde die original BAL-Sequenz in vier strukturell wichtige Einheiten unterteilt; *BAL*: N-terminaler Bereich (1 - 550 AS), *Helix*: die zu deletierende α -Helix (Δ 551 – 555 AS), *C-Terminus*: flexibler C-Terminus; zu deletierender Bereich (Δ 556 - 563 AS), *His₆*: Hexahistidin-Sequenz. Bei der Variante *HisBAL Δ* wurde die komplette C-Terminus kodierende Sequenz entfernt und der His-Tag an den N-Terminus verschoben. Zusätzlich wurde eine Faktor Xa-Protease Erkennungssequenz (*Xa*) zwischen His-Tag und *BAL*-Sequenz eingefügt. Bei der Variante *BAL Δ His* wurde nur die α -Helix und der C-Terminus kodierende Sequenzbereich der BAL deletiert.

Aufgrund der großen Deletion von 13 Aminosäuren und zusätzlich 6 Histidinen am C-Terminus konnte ein Verlust der strukturellen Integrität des Enzyms nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde alternativ eine zweite Variante geplant bei der der His-Tag C-terminal erhalten blieb, während die α -Helix und der C-Terminus entfernt wurden (Abb. 76).

Eine Ligaseaktivität konnte für beide Varianten mit Benzaldehyd und 3,5-Dimethoxybenzaldehyd als Substraten nachgewiesen werden (Kocot, 2010). Da die ermittelten Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten beider Deletionsvarianten absolut vergleichbar waren, wurden nur die kinetischen Parameter der Variante HisBAL Δ bestimmt. Die kinetischen Analysen ergaben eine um das 3-5-Fach verminderte Ligaseaktivität gegenüber der Wildtyp BAL. Mit (*R*)-3,3',5,5'-Tetramethoxybenzoin ist auch die Lyaseaktivität um etwa das 3-4-Fache verringert. Demgegenüber liegen die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten der Deletionsvariante für die Benzoinspaltung in einem ähnlichen Bereich wie die der Wildtyp BAL (Kocot, 2010).

Sofern ermittelbar waren die K_M -Werte für die Ligase- sowie Lyaseaktivität für die Deletionsvariante größer als die K_M -Werte des Wildtyps. Die höheren K_M -Werte der Variante im Vergleich zum Wildtypenzym deuten auf eine geringere Affinität der Variante gegenüber den Benzaldehyd-Derivaten sowie den Benzoinen, was auf eine weniger stabile Bindung im aktiven Zentrum hinweist. Vermutlich dient der C-Terminus zur Stabilisierung der Bindung der jeweiligen Substrate im aktiven Zentrum, indem er den relativ großen Reaktionsraum verschließt und somit die lokale Substratkonzentration erhöht. Möglicherweise unterstützt er dabei sogar die korrekte Positionierung der Substrate im aktiven Zentrum. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Präsenz des C-terminalen Bereichs in der BAL im Hinblick auf die aktivitätsbestimmenden Parameter eher förderlich ist und die möglicherweise sterisch gehemmte Produktfreisetzung durch den verengten Substratkanal, eher einen untergeordneten Einfluss hat. Bezüglich der Selbstligation zweier Benzaldehyde zeigt die HisBAL Δ tatsächlich Charakteristika der BFDH281A (Kocot, 2010). Eine Überprüfung der Stereoselektivität bei der Synthese von (*R*)-Benzoin (Kapitel 3.8.2) ergab keinen Unterschied gegenüber dem Wildtyp ($ee > 99,9\%$).

Interessanterweise stellte sich heraus, dass die Anwesenheit von DMSO im Puffer für die katalytische Aktivität der HisBAL Δ unbedingt erforderlich ist. Auch bei hohen Enzym-

konzentrationen (50 µg/ml) konnte ohne DMSO Zugabe keine Aktivität nachgewiesen werden (Kocot, 2010). Ein Vergleich der Stabilitäten in Puffer und mit 30 vol% DMSO zeigt, dass die HisBAL Δ in Puffer ohne Kosolvents schneller an Aktivität verliert als bei Inkubation mit Kosolvents (Abb. 77 A). Für die Messung der relativen Aktivität wurde jeweils eine Substratlösung mit 20 mM 4-Chlorbenzaldehyd und 30 vol% DMSO zu den Proben gegeben, um die Aktivität der Varianten zu gewährleisten. Innerhalb von 2 min verlief die Reaktion mit der gewählten Enzymkonzentration für alle Enzymvarianten linear (ohne Abb.), so dass die Ermittlung des Umsatzes nach 2 Minuten als Bezugsgröße für die relative Aktivität verwendet werden konnte.

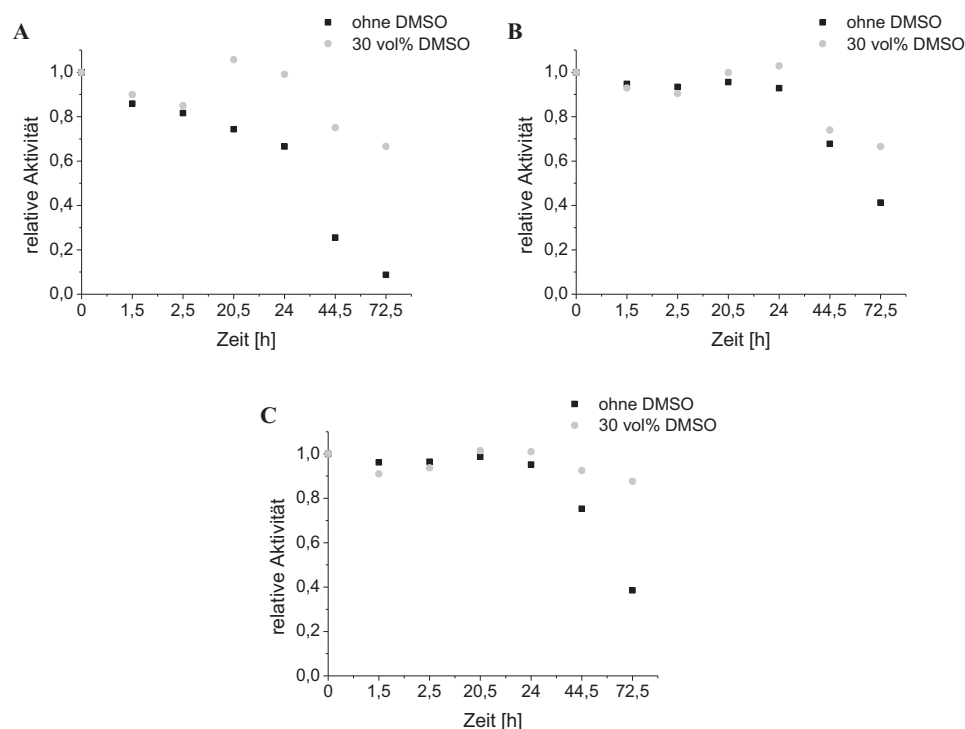


Abb. 77: Stabilität der Deletionsvarianten HisBAL Δ (A), BAL Δ His (B) und der Wildtyp BAL (C) in Puffer ohne Zugabe von DMSO und mit 30 vol% DMSO. Lagerung: 20 µg/ml Enzym in 50 mM TEA-Puffer, pH 8; 0,5 mM ThDP, 2,5 mM MgSO₄; ohne und mit 30 vol% DMSO; T=25 °C. Ermittlung der Aktivität: 4 µg/ml Enzym in 50 mM TEA-Puffer, pH 8; 0,5 mM ThDP, 2,5 mM MgSO₄; 30 vol% DMSO; 20 mM 4-Chlorbenzaldehyd; T=25 °C.

Innerhalb des Zeitraums vom Lösen des gereinigten Lyophilisats bis zur Messung der Aktivität (max. 5 Stunden) ist die Stabilität der BAL in reinem Puffer gut genug, um eine

Ligaseaktivität nachzuweisen. Das Kosolvents ist also tatsächlich zwingend notwendig für die Aktivität der HisBAL Δ . Weiterhin kann durch DMSO eine Stabilisierung der Variante erreicht werden.

Die Deletionsvariante mit C-terminalen His-Tag (BAL Δ His), weist im Vergleich zur Deletionsvariante mit N-terminalen His-Tag (HisBAL Δ) eine erhöhte Stabilität in Puffer ohne Kosolvents auf (Abb. 77 B). Nach 72,5 Stunden betrug die Restaktivität noch etwa 40%, während mit der HisBAL Δ nur noch eine Restaktivität von knapp 10% ermittelt wurde. Durch Zugabe von 30 vol% DMSO konnte aber keine weitere Stabilisierung der BAL Δ His erreicht werden. Bei Inkubation mit und ohne DMSO ist die Stabilität der BAL Δ His vergleichbar mit der Stabilität der Variante HisBAL Δ . Möglicherweise führt eine Anlagerung von DMSO an der verkürzten Variante mit frei liegendem C-Terminus (HisBAL Δ) zu einer strukturellen Stabilisierung, welche bei der Variante BAL Δ His bereits durch den C-terminalen His-Tag erreicht wird. Die Stabilisierung einer Reihe von Enzymen durch DMSO ist bereits in der Literatur beschrieben. Hier wird eine Stabilisierung durch die optimale Hydratisierung (siehe Kapitel 1.2.2) der Enzyme durch das Kosolvents als Ursache der Stabilisierung vermutet. Des Weiteren wird angenommen, dass durch die Zugabe von Kosolventien geringe Konformationsänderungen hervorgerufen werden, die bis zum Erreichen eines kritischen Maßes zu einer Stabilisierung der Enzyme führen (Kumar und Prakash, 2003).

Ein weiterer sehr interessanter Aspekt wird beim Vergleich der Deletionsvarianten mit der Stabilität der Wildtyp BAL deutlich (Abb. 77 C). Wie auch zuvor beschrieben (Kapitel 1.5.1) ist die Stabilität der BAL in Puffer mit 30 vol% DMSO gegenüber der Lagerung in reinem Puffer erhöht. Die C-terminal verkürzte Variante BAL Δ His mit C-terminalen His-Tag, zeigt in Puffer dieselbe Stabilität wie die Wildtyp BAL. Gleiches gilt für die Variante HisBAL Δ bei Lagerung in Puffer mit 30 vol% DMSO. Der C-terminale His-Tag bzw. die Inkubation in Puffer mit 30 vol% DMSO, führt also zu vergleichbaren Stabilitäten der Deletionsvarianten und der Wildtyp BAL in Puffer (ohne Zugabe von DMSO). Wie bereits erwähnt, ist ein Großteil des C-terminalen Bereichs der BAL sehr flexibel (AS 556 – 563). Des Weiteren enthält der C-Terminus überwiegend hydrophobe Aminosäurereste (etwa 75%, siehe Kapitel 4.3.3.2). Möglicherweise wird die Konformation dieses Bereichs durch DMSO im wässrigen Puffer verändert. Unter diesen Bedingungen führt der C-Terminus im Vergleich zu den verkürzten Varianten wiederum zu einer höheren Stabilität.

Fazit: Es hat also den Anschein, dass die Stabilisierung der BAL durch DMSO als Kosolvents, zumindest zum Teil durch eine Beeinflussung des flexiblen C-Terminus erreicht wird. Der C-Terminus ist also nicht unbedingt nur an der katalytischen Aktivität der BAL entscheidend beteiligt, sondern vermutlich auch an der Stabilität der BAL.

4.3.3.2 Einfluss des C-Terminus auf die Stabilität der BAL gegenüber aromatischen Aldehyden

Da die sich BAL Deletionsvarianten hinsichtlich der Kinetik der Ligasereaktion (fehlende Substratsättigung) ähnlich wie die *BFDH281A* verhalten (Kocot, 2010), sollte nun auch ihre Stabilität gegenüber aromatischen Aldehyden überprüft werden. Hierbei wurde entsprechend den Versuchen mit der Wildtyp BAL verfahren (Kapitel 3.10.3). Erste Versuche von Kocot zeigten tatsächlich eine signifikante Stabilisierung der HisBAL Δ gegenüber Benzaldehyd (Kocot, 2010). Mit einer k_{des} von $0,47\% \text{ min}^{-1}$ zeigt die Variante eine etwa 5-fach erhöhte Stabilität gegenüber Benzaldehyd im Vergleich zur Wildtyp BAL (k_{des} : $2,5 \pm 0,8 \text{ \% min}^{-1}$; diese Arbeit). Auch bei Inkubation mit einer wesentlich höheren Benzaldehydkonzentration (15 mM) konnte keine signifikant erhöhte Inaktivierung beobachtet werden (k_{des} : $0,51\% \text{ min}^{-1}$) (Kocot, 2010).

Aufgrund der von Kocot ermittelten Stabilisierung der HisBAL Δ Variante gegenüber Benzaldehyd, sollte auch ihre Sensitivität gegenüber 3,5-Dimethoxybenzaldehyd und 4-Chlorbenzaldehyd überprüft werden. Außerdem wurde die Variante BAL Δ His überprüft, um auszuschließen, dass die beobachtete Stabilisierung in der Verlegung des His-Tags zum N-Terminus begründet ist. Theoretisch wäre auch eine Schiffbasenbildung der Aldehyde mit der α -Aminogruppe des oberflächenlokalisierten N-terminalen Methionins denkbar.

Ein Vergleich der ermittelten Desaktivierungskonstanten zeigt, dass beide Deletionsvarianten eine signifikante Stabilisierung gegenüber Benzaldehyd (HisBAL Δ k_{des} : $0,5\% \text{ min}^{-1}$; BAL Δ His k_{des} : $0,4\% \text{ min}^{-1}$) und 3,5-Dimethoxybenzaldehyd aufweisen (HisBAL Δ k_{des} : $0,2\% \text{ min}^{-1}$; BAL Δ His k_{des} : $0,2\% \text{ min}^{-1}$). Dies entspricht einer Stabilisierung um das 5-10 Fache gegenüber der Wildtyp BAL. Gegenüber 4-Chlorbenzaldehyd zeigen beide Deletionsvarianten keine nennenswerte Stabilisierung (HisBAL Δ k_{des} : $2,1\% \text{ min}^{-1}$; BAL Δ His k_{des} : $2,7\% \text{ min}^{-1}$) im Vergleich zum Wildtyp. Ein Vergleich der beiden Varianten ergab keine Unterschiede (Abb. 78). Die Stabilisierung der HisBAL Δ gegenüber Benzaldehyd ist also

tatsächlich durch das Fehlen der C-terminalen Struktur und nicht durch die Verlagerung des His-Tags begründet.

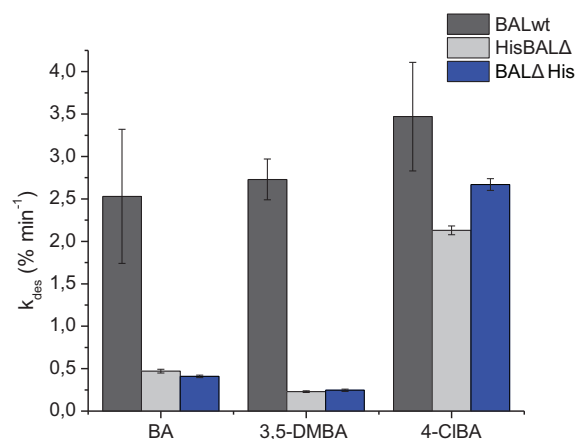


Abb. 78: Inaktivierungsraten der BAL Deletionsvarianten mit Benzaldehyd, 4-Chlorbenzaldehyd und 3,5-Dimethoxybenzaldehyd. Inaktivierungsansatz: 20 µg/ml BAL in 50 mM TEA-Puffer, pH 8; 0,5 mM ThDP, 2,5 mM MgSO₄; 30 vol% DMSO; 2 mM Substrat; T=25 °C. Die Standardabweichungen der Wildtyp BAL beziehen sich auf die empirisch ermittelten Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die anderen Standardabweichungen ergeben sich aus der Berechnung von k_{des} eines Experiments und stellen keine empirisch ermittelten Standardabweichungen dar.

Der deletierte Bereich der BAL besteht zu 75% (ohne Berücksichtigung des His-Tags), aus Aminosäuren mit apolaren und damit hydrophoben Seitenketten (siehe unten). Eine so hohe Dichte an hydrophoben Aminosäuren in exponierten Bereichen von Proteinen ist eher ungewöhnlich. Ausgedehnte hydrophobe Bereiche lagern sich normalerweise, abgeschildert von der wässrigen Umgebung, im Kern von Proteinen an und unterstützen so die native Faltung.

Aber auch der Reaktionsraum, also das aktive Zentrum, der THDP-abhängigen Enzyme besteht aus einem relativ großen Anteil hydrophober Aminosäuren, so wird unter anderem die notwendige Umgebung für die Aktivierung des ThDP geschaffen (Kapitel 1.4.1). In Tabelle 15 sind die Aminosäuren, welche im oder in unmittelbarer Nähe vom aktiven Zentrum der BAL und zum Vergleich der BFD lokalisiert sind, aufgelistet. In der BAL sind 12 und in der BFD 10 Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten im aktiven Zentrum und dem Substratkanal lokalisiert (AS bis Position 484).

Tabelle 15: Aminosäuren im oder in unmittelbarer Nähe vom aktiven Zentrum (Substratkanal) der BAL und der BFD (persönliche Mitteilung Apl. Prof. Dr. Martina Pohl, IBT2). AS die sich in ihrer Position in der BAL und der BFD entsprechen, sind direkt gegenübergestellt. AS die direkt an der Ausbildung des aktiven Zentrums beteiligt sind, sind fett gedruckt. Die hydrophoben Aminosäuren sind blau markiert: mit Tryptophan (sehr hydrophobe Seitenkette) in **dunkelblau**, Alanin (schwach hydrophobe Seitenkette) in **blassblau** und Phenylalanin, Methionin, Prolin sowie Leucin (hydrophobe Seitenketten) in **hellblau**. Das His281, welches in der BFDH281A mit Alanin ausgetauscht wurde ist zusätzlich **grün** markiert. Der in den BAL-Varianten deletierte Bereich ist durch ein (Δ) markiert.

BAL	BFD	BAL	BFD	BAL	BFD
Leu 25	Asn 23	Tyr 239		Met 421	Leu 403
His 26	Pro 24	Leu 282		Tyr 453	Tyr 433
Gly 27	Gly 25	Asn 283		Trp 478	Tyr 458
Ala 28	Ser 26		Asn 282	Ala 480	Ala 460
His 29	Asn 27		Asn 284	Thr 481	
His 49	Gln 46	His 286	His 281	His 483	Trp 463
Glu 50	Glu 47	Ala 394	Thr 377	Phe 484	Phe 464
Thr 73	His 70	Leu 395			Leu 461
Gly 77	Gly 74		Ala 381	Pro 550	C-terminaler Bereich der BAL, welcher in der BFD fehlt
Asn 80	Asn 77	Tyr 397	Phe 397	Pro 551 (Δ)	
Thr 111		Leu 398	Thr 380	Glu 552 (Δ)	
Leu 112	Leu 109	His 415	Cys 398	Glu 553 (Δ)	
Gln 113	Leu 110	Gly 419	Gly 401	Leu 554 (Δ)	
Trp 163		Ser 420	Gly 402	Ile 555 (Δ)	

Die Anordnung der hydrophoben Aminosäuren an den aktiven Zentren der BAL und der BFD sind in Abb. 79 dargestellt. Hier wird deutlich, dass in der BAL ausgedehnte Bereiche an hydrophoben Aminosäureresten vor allem im Zugang zum aktiven Zentrum lokalisiert sind. Es ist sehr gut vorstellbar, dass die α -Helix (AS 551-555) und der flexible C-Terminus (AS 556-563: **L-I-G-M-D-P-F-A**) mit diesen Resten über hydrophobe Wechselwirkungen interagieren.

Unter Berücksichtigung der kinetischen Analysen von Kocot, welche eine geringere Aktivität, sowie Affinität der Deletionsvariante HisBAL Δ gegenüber den aromatischen Aldehyden (Kocot, 2010) ergaben, kann vermutet werden, dass α -Helix und hydrophober C-Terminus den Reaktionsraum verschließen und somit für die hydrophoben Substrate und Produkte eine optimale Umgebung schaffen. So könnte die lokale Aldehydkonzentration im aktiven Zentrum der BAL höher sein, als bei der BFD mit einem freien Zugang zum Reaktionsraum (Abb. 75, Abb. 79). Eine mögliche Konsequenz hieraus könnte wiederum die hydrophobe Bindung der Aldehyde im Bereich katalytisch wichtiger Positionen sein, welche zu der Inaktivierung führt.

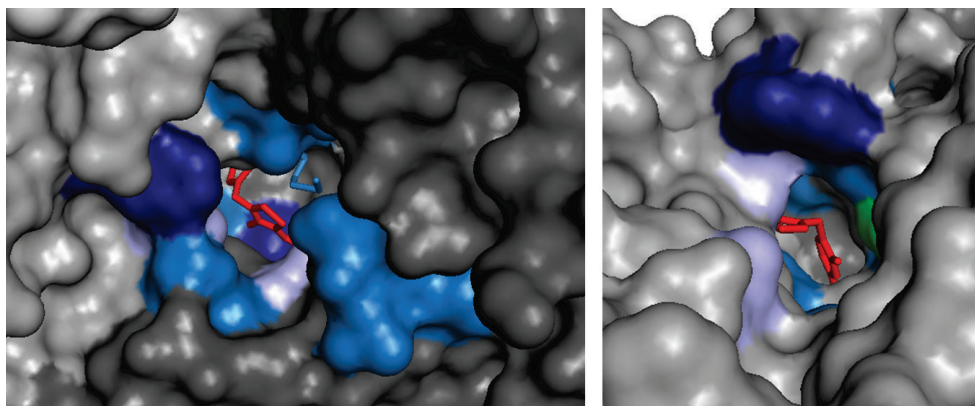


Abb. 79: Hydrophobe Aminosäuren an den aktiven Zentren der BAL (links, PDB: 2AG0) und der BFD (rechts, PDB: 2w3v). Die Monomere eines Dimers sind in hellgrau und grau dargestellt. Der Kofaktor ThDP ist **rot** abgebildet. Die hydrophoben Aminosäuren sind blau markiert: mit Tryptophan (sehr hydrophobe Seitenkette) in **dunkelblau**, Alanin (schwach hydrophobe Seitenkette) in **blassblau** und Phenylalanin, Methionin, Prolin sowie Leucin (hydrophobe Seitenketten) in **hellblau**. Das His281, welches in der BFDH281A mit Alanin ausgetauscht wurde ist zusätzlich **grün** markiert. Methionin 421 (BAL) wird in der Oberflächendarstellung nicht angezeigt und ist deshalb durch seine Strukturformel dargestellt. Die Abbildungen wurden mit dem Programm PyMOL erstellt.

Eine ähnlich schnelle Inaktivierung durch Benzaldehyd ist mit der ThDP-abhängigen Pyruvatdecarboxylase (PDC) aus *Candida utilis* gefunden worden. In Gegenwart hoher Benzaldehydkonzentrationen (345-400 mM) in einem wässrig-organischem Zweiphasensystem war die PDC innerhalb von 30 Minuten vollständig inaktiv. Während durch Glycerol in der wässrigen Phase als stabilisierende Komponente keine Stabilisierung erreicht werden konnte, führte eine Zugabe des nativen Substrats Pyruvat zu einer geringeren Sensitivität der PDC. Nach 1 Stunde unter Prozessbedingungen war sie noch zu 100% aktiv (Rosche *et al.*, 2005b). Eine Vielzahl von PDCs zeigt eine Pyruvat-abhängige Aktivierung, wobei durch die Bindung von Pyruvat an den Enzymen ausgedehnte strukturelle Änderungen hervorgerufen werden. Diese führen von einer offenen Struktur zu einer kompakten, geschlossenen Konformation, in der z.B. die aktiven Zentren von dem umgebenen Medium abgeschirmt werden (Hübner *et al.*, 1990, Lu *et al.*, 2000). Womöglich könnte eine Stabilisierung der PDC gegenüber Benzaldehyd durch die kompakte Konformation und damit geringere Zugänglichkeit für die Aldehyde hervorgerufen werden. Ein solcher Ansatz ist für die BAL natürlich ausgeschlossen. Die Beobachtungen verdeutlichen aber, wie entscheidend strukturelle Eigenschaften der ThDP-abhängigen Enzyme für die Aldehyd-induzierte Inaktivierung sein können.

Fazit: Bei der BAL könnte die Aldehyd-induzierte Inaktivierung z.B. durch hydrophobe Interaktion mit dem hydrophoben C-Terminus selbst herbeigeführt werden. Eine Beeinflussung des C-Terminus durch die Aldehyde könnte zum einen zu einer verminderten Aktivität führen, da er seine unterstützende Funktion bei der Katalyse nicht mehr nachkommen kann. Zum anderen scheint der C-Terminus auch an der Stabilität der BAL beteiligt zu sein (Kapitel 4.3.3.1), so dass hydrophobe Wechselwirkungen mit den Aldehyden zu inaktivierenden Konformationsänderungen führen könnten. Die Inaktivierung der BAL in Anwesenheit des C-Terminus, könnte auch auf einen Einschluss der aromatischen Aldehyde und/oder Produkte im Reaktionsraum zurückgehen, welcher zu einer lokal erhöhten Konzentration der Reaktanden führt. So könnten hydrophobe Wechselwirkungen mit katalytisch wichtigen Positionen (oder dem C-Terminus), zu einer Blockierung der Reaktion führen. Letztendlich könnten durch die hydrophoben Wechselwirkungen reversible oder irreversible Konformationsänderungen eingeleitet werden, welche die beobachtete Inaktivierung der BAL herbeiführen.

Nun zeigte sich zwar eine Stabilisierung der BAL gegenüber Benzaldehyd und 3,5-Dimethoxybenzaldehyd nach Deletion des C-Terminus, trotzdem war immer noch eine Inaktivierung zu beobachten. Die für die Varianten berechneten Halbwertszeiten ergeben etwa 2,5-2,8 Stunden gegenüber Benzaldehyd und etwa 4,7-5 Stunden gegenüber 3,5-Dimethoxybenzaldehyd. Verglichen mit den Lagerstabilitäten der Varianten (Abb. 77) ist dies aber immer noch eine signifikante Inaktivierung durch die Aldehyde. Des Weiteren zeigten die Deletionsvarianten gegenüber 4-Chlorbenzaldehyd keine oder nur eine geringe Stabilisierung im Vergleich zum Wildtyp auf. Dies bestätigt die bisherigen Beobachtungen, dass nicht nur ein Mechanismus der Inaktivierung der BAL durch die Aldehyde vorliegt. Des Weiteren wird deutlich, dass die Aldehyde einen ganz unterschiedlichen Einfluss auf die verschiedenen Mechanismen haben müssen. So führen Benzaldehyd und 3,5-Dimethoxybenzaldehyd vor allem zu dem durch die Anwesenheit des C-Terminus initiierten Inaktivierungsprozess, während die Inaktivierung durch 4-Chlorbenzaldehyd hauptsächlich über wenigstens einen weiteren Mechanismus eingeleitet wird.

Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit geben erstmals eindeutige Hinweise auf die molekularen Ursachen der Inaktivierung der BAL gegenüber den aromatischen Aldehyden. Aufgrund der geringeren Aktivität der C-terminal verkürzten Deletionsvarianten, stellen diese aber wahrscheinlich keine Lösung für den Einsatz in Syntheseprozessen dar. Mittels der in

dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse bieten die Deletionsvarianten aber die Möglichkeit zur Analyse und dem besseren Verständnis des Reaktions- sowie Inaktivierungsprozess. Aufgrund der hohen Aktivität der BAL zu Beginn einer Reaktion und der Inaktivierung innerhalb kurzer Zeiträume, erscheint die Zugabe von frischem Enzym zu distinkten Zeitpunkten bis zum Erreichen des vollständigen Umsatzes, in wässrig-organischen Zweiphasensystemen mit hohen Substratkonzentrationen und langen Reaktionszeiten, als die beste Lösung. In homogenen Reaktionssystemen ist der Einsatz der aromatischen Aldehyde aufgrund der geringen Löslichkeit nur begrenzt möglich. Hier sollte eine ausreichend hohe Menge an BAL eingesetzt werden, um einen vollständigen Umsatz vor der endgültigen Inaktivierung der BAL zu erreichen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Thiamindiphosphat-abhängige Benzaldehydlyase (BAL) aus *Pseudomonas fluorescens* ist ein hoch aktiver Biokatalysator, der ein breites Spektrum an Benzaldehyden und Benzoinen als Substrate akzeptiert. Das Enzym ist strikt (*R*)-selektiv für die Ligation und Spaltung von chiralen 2-Hydroxyketonen. Da die aromatischen Aldehyde und Benzoinen in wässrigem Puffer nur schwer löslich sind, sind effiziente Arbeiten mit der BAL nur in Gegenwart organischer Kosolventien möglich, die wahlweise wassermischbar oder nicht mischbar sind. In gerührten wässrig-organischen Zweiphasensystemen (Emulsionen) konnten in vorangegangenen Arbeiten hohe Umsatzraten und Ausbeuten zur Synthese aromatischer und heteroaromatischer 2-Hydroxyketone ausgehend von preiswerten Aldehyden erreicht werden. Allerdings wurde eine schnelle Inaktivierung unter Prozessbedingungen beobachtet, die auf die Aldehyde zurückgeführt wurde. In der vorliegenden Arbeit, wurden erstmals alle maßgeblichen Inaktivierungsfaktoren in ein- und zweiphasigen Systemen, soweit möglich, getrennt voneinander untersucht, um so die entscheidenden Faktoren zu identifizieren. Im gerührten Emulsionssystem können diese vielfältig sein:

- Rühreffekte
- Interphaseneffekte
- pH-Wert
- Molekulare Toxizität des organischen Lösungsmittel
- Molekulare Toxizität der Substrate und Produkte
- Oxidation des Enzyms z.B. durch Luftsauerstoff
- Kinetische Inhibierung durch Substrate und Produkte

Oxidation und Rühreffekte:

Die BAL wurde vergleichend zu einer Variante der Benzoylformiatdecarboxylase, die *BFDH281A*, welche zwar eine zur BAL sehr ähnliche Struktur hat, aber generell eine höhere Stabilität auch gegenüber Aldehyden zeigt, untersucht. Eine durch Oxidationsprozesse hervorgerufene Inaktivierung beider Enzyme konnte ausgeschlossen werden. Während die BAL eine hohe Stabilität gegenüber magnetischen Rührprozessen aufwies ($t_{1/2}$: ca. 91-133 h; $t_{1/2}$ der Kontrolle: > 170 h), zeigte die *BFDH281A* besonders bei pH 6,5 eine rasche Inaktivierung gegenüber dem magnetischen Rühren, welche mit einer sichtbaren Präzipitation des Enzyms bereits nach dreistündiger Inkubation einherging. Die SDS-PAGE Analyse ergab

zusätzlich eine Fragmentierung des Enzyms, welche vermutlich durch die Reibung des Rührfisches am Gefäßboden hervorgerufen wurde. Bei höheren pH-Werten (pH 7 und pH 8) konnte eine Stabilisierung der BFDH281A gegenüber den Rühreffekten beobachtet werden, des Weiteren wies sie eine hohe Stabilität gegenüber einem metallischen Kopfrührer auf. Die bei den magnetischen Rührprozessen hervorgerufene Inaktivierung ist somit vermutlich in einer pH-abhängigen Adsorption der BFDH281A an der hydrophoben Oberfläche des Rührfisches begründet, welche zu einer Entfaltung und Aggregation der Enzymmoleküle führt. Die BAL scheint solchen Adsorptionsprozessen in einem geringeren Maß zu unterliegen. Die Unterschiede zwischen den beiden Enzymen beim magnetischen Rühren sind vermutlich durch die verschiedenen isoelektrischen Punkte (pI) begründet. Bei pH-Werten am pI eines Proteins ist seine Adsorption an Grenzflächen am größten. Da die BFD ihren pI bei pH 6,5 (Hasson *et al.*, 1995) und die BAL bei pH 4,6 hat (Janzen *et al.*, 2006), ist die Wahrscheinlichkeit einer Adsorption der BFDH281A an der hydrophoben Oberfläche des Rührfisches, bei den untersuchten pH-Werten, höher als bei der BAL.

Interphaseneffekte und molekulare Lösungsmitteltoxizität:

Das organische Lösungsmittel Methylisobutylketon (MIBK) zeigte unterhalb der Löslichkeitsgrenze (ca. 5% v/v) keinen negativen Effekt auf die Stabilität der BAL. Eine molekulare Toxizität durch in der Wasserphase vorhandene Lösungsmittelmoleküle liegt also nicht vor. Bei Verwendung von MIBK oberhalb der Löslichkeitsgrenze in Puffer wurde bereits ohne ein Durchmischen der beiden Phasen eine erhöhte Inaktivierung beobachtet ($t_{1/2}$: 108 ± 17 h). Eine Grenzflächentoxizität von MIBK gegenüber der BAL liegt also vor. Durch kontinuierliches Rühren der beiden Phasen unter Ausbildung einer Emulsion sank die Halbwertszeit um weitere 75% ($t_{1/2}$: 26 ± 7 h). Die erhöhte Inaktivierung setzt sich vermutlich aus der vergrößerten Grenzfläche und dem Einfluss des magnetischen Rührens zusammen.

Inaktivierung durch aromatische Aldehyde:

Demgegenüber zeigte die BAL in Anwesenheit geringer Aldehydkonzentrationen (≤ 2 mM), bereits im homogenen Reaktionssystem, eine schnelle Inaktivierung innerhalb weniger Minuten. Für die Inaktivierungsanalysen mit verschiedenen substituierten Benzaldehyd-Derivaten wurde ein HPLC-basierter Test entwickelt, welcher es ermöglichte, die Restaktivität der BAL nach Inkubation mit den Aldehyden zu distinkten Zeitpunkten zu ermitteln, ohne dass ein zweiter Aldehyd eingesetzt werden musste. So wurde die Bildung von Mischprodukten und eine Verfälschung des Ergebnisses vermieden. Die Inaktivierung

durch die aromatischen Aldehyde erwies sich als sehr komplex und inhomogen. Je nach eingesetztem Aldehyd wurden unter gleichen Bedingungen Halbwertszeiten von 4-100 Minuten ermittelt (Tabelle 10). Ein Zusammenhang zwischen der Elektronegativität, dem sterischen Anspruch oder der Position des Substituenten sowie der Carboligaseaktivität gegenüber den Aldehyden und der Inaktivierungsrate konnte aber nicht gefunden werden. Aufgrund der beobachteten Unterschiede wurden drei Aldehyde als Standardsubstrate (Benzaldehyd, BA; 4-Chlorbenzaldehyd, 4-CIBA und 3,5-Dimethoxybenzaldehyd, DMBA) ausgewählt, um die unterschiedlichen Einflüsse zu untersuchen. Es stellte sich heraus, dass die Inaktivierung durch die Aldehyde zum Teil reversibel ist. Nach Inkubation und fast vollständiger Inaktivierung mit 2-Methoxybenzaldehyd konnte die Aktivität, nach Entfernung des Aldehyds mittels Gelfiltration, sogar gänzlich wiederhergestellt werden. Weiterhin zeigte sich, dass die Inaktivierung abhängig vom Enzym-Substrat-Verhältnis ist, was zum einen auf eine definierte Bindungsstelle in der BAL (kovalent oder nicht kovalent) und zum anderen auf unterschiedliche Affinitäten dieser Positionen zu den Aldehyden hinweist. Pro Mol Enzym (Tetramer) reichte schon ein Überschuss von etwa 2.500-50.000 der untersuchten Aldehyde aus, um die maximale Inaktivierungsrate zu erreichen.

pH-abhängige Effekte:

Des Weiteren konnte eine pH-Abhängigkeit der Inaktivierung durch die Aldehyde gefunden werden. Bei einer Senkung des pH-Werts des Puffers von pH 8 auf pH 7 zeigte die BAL eine bis zu 5-fach höhere Stabilität. Wieder war der Grad der Stabilisierung und der pH-Abhängigkeit für die verschiedenen Aldehyde sehr unterschiedlich ausgeprägt. Aufgrund der Stabilisierung der BAL gegenüber den Substraten bei niedrigeren pH-Werten, wurde die Möglichkeit untersucht, einen Reaktionsprozess durch Senkung des pH-Werts zu optimieren. So wären zumindest in der Theorie, vergleichbare Umsätze mit weniger Enzymeinsatz zu erreichen. Ein Vergleich der Aktivität und Stabilität gegenüber den Standardaldehyden ergab 4-Chlorbenzaldehyd als einen potentiellen Kandidaten für einen solchen reaktionstechnischen Optimierungsansatz. Es stellte sich aber heraus, dass bei einem pH von 7 die katalytische Aktivität der BAL nicht lange genug aufrecht erhalten werden konnte, um einen vollständigen Umsatz zu gewährleisten. Wohingegen die katalytische Aktivität der BAL bei pH 8 und 9 so hoch ist, dass ein Großteil des Umsatzes bereits vor der vollständigen Inaktivierung erreicht werden kann. Eine Optimierung von Syntheseprozessen durch die Senkung des pH-Wertes, ist aufgrund dieser Ergebnisse also kein geeignetes Mittel.

Molekulare Ursachen der Inaktivierung durch aromatische Aldehyde:

In allen Arbeiten, bei denen eine Inaktivierung der BAL durch die Aldehyde beschrieben wurde, wurde eine Schiffbasenbildung über eine kovalente, reversible Bindung der Aldehyde an Lysinreste der BAL als Ursache vermutet. Schiffbasen können nur ausgebildet werden, wenn freie Aminogruppen insbesondere auf der Enzymoberfläche (N-Terminus und ϵ -Aminogruppen eines Lysinrestes) deprotoniert vorliegen. Deshalb sollte ihre Dissoziationskonstante (pK_S -Werte) unterhalb des Umgebungs-pH-Werts liegen. Strukturvergleiche mit der, gegenüber den aromatischen Aldehyden wesentlich stabileren BFDH281A (Kocot, 2010) sowie PROPKA-Berechnungen der pK_S -Werte der Lysinreste ergaben als einzigen möglichen Angriffspunkt für eine solche Schiffbasenbildung das Lys127 in der BAL. Dieser Lysinrest befindet sich im Zentrum der tetrameren Struktur. Aminosäureaustausche in diesem Bereich führten aber zu keiner Stabilisierung gegenüber den aromatischen Aldehyden, so dass eine signifikante Inaktivierung durch die Bildung von Schiffbasen ausgeschlossen werden konnte.

Vielversprechend waren jedoch Untersuchungen mit C-terminal verkürzten BAL-Varianten, die in diesem Bereich der BFDH281A angepasst wurde. Diese BAL-Varianten zeigten zumindest gegenüber zweien der drei Standardaldehyde eine signifikante Stabilisierung (BA $t_{1/2}$: ca. 2,5-2,8 h; DMBA $t_{1/2}$: 4,7-5 h; 4-ClBA $t_{1/2}$: 0,4-0,5 h). Gegenüber Benzaldehyd und 3,5-Dimethoxybenzaldehyd konnte also eine Stabilisierung um etwa das 5-10-fache im Vergleich zur Wildtyp-BAL beobachtet werden, während gegenüber 4-Chlorbenzaldehyd keine Stabilisierung gefunden wurde. In den Varianten ist der C-terminale Bereich um 13 Aminosäuren verkürzt, so wurde der Zugang zum aktiven Zentrum erweitert. Bei einer der Varianten wurde der für die Reinigung über Ni^{2+} NTA fusionierte His-Tag an den N-Terminus verlegt (HisBAL Δ), während er bei der anderen Variante C-terminal erhalten blieb (BAL Δ His). Neben der nachgewiesenen Bedeutung des C-Terminus für die Katalyse der BAL (Kocot, 2010), ist dieser also auch an der durch die aromatischen Aldehyde hervorgerufenen Inaktivierung beteiligt. Ein Einschluss der aromatischen Aldehyde und/oder Produkte im Reaktionsraum durch den hydrophoben C-Terminus, welcher zu einer lokal erhöhten Konzentration der Aldehyde führt, könnte hydrophobe Wechselwirkungen mit katalytisch wichtigen Positionen oder dem C-Terminus selbst bewirken. Letztendlich könnten durch die hydrophoben Wechselwirkungen reversible oder irreversible Konformationsänderungen induziert werden, welche in der irreversiblen Inaktivierung der BAL resultieren. Die Unterschiede in der Inaktivierung sowie der Reaktivierbarkeit deuteten bereits auf wenigstens zwei verschiedene Inaktivierungsprozesse hin, welche abhängig vom Substrat und pH

ablaufen. Die immer noch verhältnismäßig rasche Inaktivierung der C-terminal verkürzten Varianten durch Benzaldehyd und 3,5-Dimethoxybenzaldehyd sowie die unverändert schnelle Inaktivierung durch 4-Chlorbenzaldehyd bestätigen diese Beobachtung (Abb. 78).

Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit geben erstmals eindeutige Hinweise auf die molekularen Ursachen der Inaktivierung der BAL gegenüber den aromatischen Aldehyden, wobei die oft vermutete Schiffbasenbildung an Lysinresten als Ursache der Inaktivierung weitestgehend ausgeschlossen werden konnte. Aufgrund der 3-5 fach geringeren Aktivität der C-terminal verkürzten Deletionsvarianten im Vergleich zum Wildtypenzym, stellen diese aber vermutlich keine Lösung für den Einsatz in Syntheseprozessen dar. Analysen der Aktivität, Stabilität und der Mikroreaktionskonstanten könnten aber Aufschluss über die Bedeutung des C-Terminus für den Katalysemechanismus und die strukturelle Integrität der BAL geben. Die kinetische Auswertung von verschiedenen Umsatz-Kurven zur Analyse des Einflusses des C-Terminus auf die Produktfreisetzung wird derzeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Antje Spieß an RWTH-Aachen Universität bearbeitet. So könnte die bisherige Vermutung, dass der C-Terminus den Reaktionsraum gegenüber der umgebenden Lösung wirksam abschirmt, bestätigt werden. Dies würde ebenfalls den hier beschriebenen Inaktivierungsprozess weiter erklären.

Aufgrund der Vielfalt in der Art und der Ausprägung der Aldehyd-induzierten Inaktivierung scheint eine Stabilisierung durch den Austausch einzelner Aminosäuren eher unwahrscheinlich. Möglicherweise sind multiple Mutationen notwendig, um tatsächlich eine Stabilisierung gegenüber verschiedenen Aldehyden zu erreichen. Diese bergen jedoch das Risiko, dass es zu strukturellen Änderungen und damit zur Inaktivierung und einer verminderten Strukturstabilität aufgrund der Mutationen kommen kann, so dass eine Mutation des Enzyms zur Stabilisierung gegenüber den Aldehyden eher unzweckmäßig ist. Da die BAL eine sehr hohe katalytische Aktivität zu Beginn einer Reaktion zeigt, welche aber mit einer schnellen Inaktivierung einhergeht, erscheint die Zugabe von frischem Enzym zu distinkten Zeitpunkten bis zum Erreichen des vollständigen Umsatzes, in wässrig-organischen Zweiphasensystemen mit hohen Substratkonzentrationen, als die beste Lösung. In Reaktionsansätzen mit organischen Lösungsmitteln als Kosolventien ist der Einsatz der aromatischen Aldehyde aufgrund der geringen Löslichkeit nur begrenzt möglich. In solchen Systemen kann eine einmalige Enzymzugabe in relativ hoher Konzentration als sinnvoll erachtet werden. So kann ein vollständiger Umsatz in kürzester Zeit, vor der endgültigen Inaktivierung der BAL erreicht werden.

6 Conclusion and Outlook

The thiamine diphosphate-dependent benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens* is a highly active biocatalyst, which accepts a broad substrate range of benzaldehyde- and benzoin derivatives. Furthermore, BAL is highly (*R*)-selective for the ligation and cleavage of chiral 2-hydroxy ketones. The aromatic aldehydes and benzoin are hardly soluble in aqueous media; therefore the application of water miscible or immiscible cosolvents is necessary to work efficiently. Reactions performed in stirred aqueous/organic two-phase systems (emulsions) result in high conversion rates and yields for aromatic and heteroaromatic 2-hydroxy ketones, starting from cheap aldehydes. However, a very fast inactivation of BAL was observed under process conditions, which is assumed to be caused by the aldehydes. In the present study the inactivating processes of BAL were dissected as far as possible, in order to identify the relevant factors, which can be various in stirred emulsion systems, like:

- Stirring effects
- Interface effects
- Molecular toxicity of the organic solvent
- Molecular toxicity of the substrates and products
- Oxidation of the enzyme, *e.g.* by atmospheric oxygen
- Kinetic inhibition by the substrates or products

Oxidation and stirring effects:

BAL was investigated relative to a variant of benzoylformate decarboxylase (BFDH281A), which is generally more stable than the BAL, even towards aldehydes (Kocot, 2010). Inactivation by oxidation processes could be excluded for both enzymes, in the present study. BAL showed a quite good stability towards magnetically stirring ($t_{1/2}$: 91-133 h; $t_{1/2}$ of non stirred control: > 170 h), while BFDH281A was rapidly inactivated, especially at pH 6.5. Inactivation of the BFD-variant was accompanied by precipitation of the enzyme already after 3 hours of stirring. Further, a partial degradation of the protein was deduced from SDS-PAGE analysis, which is probably caused by the rubbing of the stir bar on the bottom of the vessel. However, by increasing the pH to pH 7 and pH 8 stabilisation of BFDH281A could be observed, furthermore with a steel head stirrer the enzyme showed high stability. Due to the high stability with the head stirrer and high sensitivity of BFDH281A towards the magnetic stirrer especially at pH 6.5, deactivation process was deduced to adsorption of BFDH281A on

the hydrophobic surface of the magnetic stir bar. As a consequence, partial unfolding and aggregation of the BFD-variant occurs. Besides BAL is less affected by such adsorption processes. The differences in the stability of both enzymes towards magnetic stirring may be based on their unequal isoelectric points (pI). Protein adsorption onto interfaces occurs mainly when pH is near their pI. The pI of BFD is at pH 6.5 (Hasson *et al.*, 1995) and the pI of BAL is at pH 4.6 (Janzen *et al.*, 2006). Mean that an adsorption onto interfaces is more likely for BFDH281A than for BAL at the investigated pH (pH 6.5-8).

Interface effects and molecular toxicity of organic solvent:

The organic solvent methylisobutylketone (MIBK) has no negative effect on the stability of BAL up to its solubility limit (5% v/v), which means that its molecular toxicity can be neglected. However, above its solubility limit MIBK results in faster enzyme inactivation, already without mixing the two phases ($t_{1/2}$: 108 ± 17 h), which suggest an interface toxicity of MIBK. The inactivation was again 75% faster in an emulsion by continuous mixing of the two phases ($t_{1/2}$: 26 ± 7 h). This effect is supposed to be based on the enlarged interface and stirring effects.

Inactivation by aromatic aldehydes:

In contrast to the inactivation by mechanical stirring, BAL showed a very high sensitivity towards the aromatic aldehydes even at low concentrations (≤ 2 mM). Here inactivation occurs within minutes instead of hours. Before analysing the effects with different substituted benzaldehydes on the enzyme stability a HPLC-based test system was developed. This test offers the possibility to determine the residual activity of BAL after incubation with the substrates at distinct time points, without using a second substrate for activity measurements. Therefore the potential formation of mixed benzoin and thus inaccurate results was prevented. The inactivation by the aromatic aldehydes was found to be very complex and inhomogeneous. Half-lives of BAL varied between 4-100 minutes under the same conditions, depending on the substrate used for inactivation (table 10). However, no correlation of the activity (total turn over) of BAL and its inactivation with different aromatic aldehydes was observed with respect to the electronegativity, the steric demand of the substitution or the position of the substituent. For further analyses three aldehydes were chosen as standard substrates: benzaldehyde (BA), 4-chlorobenzaldehyde (4-ClBA) and 3,5-dimethoxybenzaldehyde (DMBA). It turned out that the inactivation caused by these aldehydes was partially reversible. With 2-methoxybenzaldehyde even a full reactivation of BAL was observed, after

removal of the aldehyde from the enzyme by gel filtration. Furthermore, it was found that the inactivation depends on the excess of the substrate relative to the enzyme concentration. An excess of the substrate of around 2,500 to 50,000 per mol of enzyme (tetramer) is sufficient to reach the maximum inactivation rate. This led to the assumption that BAL exhibits at least one distinct binding position (covalent or non covalent) with different affinities depending on the character of the substrate.

pH-dependent effects:

The inactivation of BAL by the aromatic aldehydes was found to be pH-dependent. A stabilisation up to 5-fold could be observed by lowering the pH from pH 8 to pH 7. Again the extend of pH-dependency of stabilisation was very different for the investigated aldehydes. The possibility to improve the process stability at neutral pH, where BAL shows higher stability was investigated in more detail for the standard aldehydes (BA, DMBA and 4-CIBA). Only 4-chlorobenzaldehyde was detected as a potential candidate for this optimisation process. However, it was found that BAL could not maintain its catalytic activity long enough to reach almost complete conversion at pH 7. Besides, the catalytic activity at pH 8 and pH 9 is high enough to reach almost full conversion, before inactivation occurs. Therefore an optimisation of synthesis processes by lowering the pH is not the matter of choice.

Molecular reasons for the inactivation by aromatic aldehydes:

All previous studies which were discussed in literature deduced the inactivation of BAL under process conditions to Schiff base formation of the aldehydes with lysine residues of the enzyme. Schiff bases can only be formed, if free amino-groups are deprotonated, especially those which are surface exposed (N-terminus or ϵ -amino groups of lysine residues). Therefore the dissociation constant (pK_a) should be lower than the environmental pH. A lysine residue (Lys127) was identified as the only potential modifiable partner, by PROPKA-calculation of the pK_a and structural comparison to BFDH281A, which is much less sensitive towards aldehydes. However, amino acid exchanges at this position did not result in stabilisation of BAL towards the aromatic aldehydes. Based on these results, an inactivation mechanism based on Schiff base formation can almost be excluded.

Promising results were obtained with BAL-variants which resembles the BFDH281A in the C-terminal part. These BAL-variants showed a significantly higher stability at least towards

two of the three analyzed aldehydes (BA $t_{1/2}$: ca. 2.5-2.8 h; DMBA $t_{1/2}$: ca. 4.7-5 h; 4-CIBA $t_{1/2}$: ca. 0.4-0.5 h). Which means that at least towards benzaldehyde and 3,5-dimethoxybenzaldehyde a 5-10-fold stabilisation was found compared to the wildtype enzyme, while no significant stabilisation towards 4-chlorobenzaldehyde was detected. In these BAL-variants 13 amino acids of the C-terminus were deleted, resulting in an enlarged entrance to the active centre. For one of the variants the C-terminal His-Tag was removed and therefore a His-Tag was fused to the N-terminus (HisBAL Δ), while the C-terminal His-Tag was kept for the other variant (BAL Δ His). The results demonstrate that the C-Terminus is involved in the inactivation process caused by the aromatic aldehydes, in addition to the previously proven importance of the C-terminus for the catalytic activity. Furthermore, Schiff base formation of the N-terminus with the aldehydes can be excluded, because both variants (with and without N-terminal His-Tag) showed the same behaviour. One reason for the inactivation may be the entrapment of the aromatic substrates and/or products in the active centre caused by the C-terminus, leading to a local increase of reactants. This could induce hydrophobic interactions with catalytic important residues in the active centre or the C-terminus itself. Finally these hydrophobic interactions could lead to reversible or irreversible conformational changes resulting in the irreversible inactivation of the BAL. The previously described differences in the inactivation as well as in the reactivation behaviour suggest that at least two inactivation processes are involved, which dependent on pH and the aldehyde. This is now proven by the still relatively fast inactivation caused by benzaldehyde and 3,5-dimethoxybenzaldehyde and the still very fast inactivation by 4-chlorobenzaldehyde.

In this work hints to the molecular reasons of the inactivation of BAL by aromatic aldehydes were found for the first time. Whereas the previously assumed Schiff base formation with lysine residues could be excluded as the main inactivation mechanism of BAL, opening the excess to the active site by removing parts of the C-Terminus was at least partially successful. Due to their 3-5-times lower activity the deletion variants are probably no alternative to the wildtype enzyme in biotransformations. However, studies about activity, stability and micro reaction constants of the deletion variants could provide important information about the relevance of the C-terminus for the catalytic cycle and the structural stability of BAL. The kinetic analysis of different conversion curves is currently done in the group of Prof. Antje Spieß at the RWTH Aachen University. They could provide more detailed information, whether the C-terminus really hampers the product release by shielding the active site toward

the surrounding solution. This would also further explain the discussed inactivation mechanism.

Due to the heterogeneity of the observed effects with different aldehydes a general stabilization of BAL can most probably not be achieved by only few amino acid exchanges. It can be assumed that multiple mutations would be necessary to achieve sufficient stabilization towards various aldehydes. However, multiple mutations bear the risk of structural destabilization and inactivation, which makes such an approach less favourable. BAL shows a very high catalytic activity in the beginning of reactions, which rapidly decreases by aldehyde induced inactivation. Therefore it seems to be the best choice to add fresh enzyme at distinct time points, when used in emulsion systems with high substrate concentrations and long reaction times. In homogeneous reaction systems with cosolvents the solubility of the aromatic compounds limits the substrate concentration applied. In such systems addition of a high enzyme concentration can be useful in order to reach full conversion before BAL is finally inactivated.

7 Literaturverzeichnis

Adam, W.; R. T. Fell; C. Mock-Knoblauch and C. R. Saha-Möller. (1996). "Synthesis of optically active alpha-hydroxycarbonyl compounds by (Salen)Mn(III)-catalyzed oxidation of silyl enol ethers and silyl ketene acetals." *Tetrahedron Letters*, 37(36), 6531-6534.

Adam, W.; R. T. Fell; V. R. Stegmann and C. R. Saha-Möller. (1998). "Synthesis of optically active alpha-hydroxy carbonyl compounds by the catalytic, enantioselective oxidation of silyl enol ethers and ketene acetals with (Salen)Mn(III) complexes." *Journal of the American Chemical Society*, 120(4), 708-714.

Adam, W.; M. Lazarus; C. R. Saha-Moller and P. Schreier. (1999). "Biocatalytic synthesis of optically active alpha-oxyfunctionalized carbonyl compounds." *Accounts of Chemical Research*, 32(10), 837-845.

Ansorge-Schumacher, M. B.; L. Greiner; F. Schroeper; S. Mirtschin and T. Hischer. (2006). "Operational concept for the improved synthesis of (R)-3,3'-furoin and related hydrophobic compounds with benzaldehyde lyase." *Biotechnol J*, 1(5), 564-568.

Antolini, M.; A. Bozzoli; C. Ghiron; G. Kennedy; T. Rossi and A. Ursini. (1999). "Analogues of 4,5-bis(3,5-dichlorophenyl)-2-trifluoromethyl-1H-imidazole as potential antibacterial agents." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 9(7), 1023-1028.

Arjunan, P.; T. Umland; F. Dyda; S. Swaminathan; W. Furey; M. Sax; B. Farrenkopf; Y. Gao; D. Zhang and F. Jordan. (1996). "Crystal structure of the thiamin diphosphate-dependent enzyme pyruvate decarboxylase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* at 2.3 angstrom resolution." *Journal of Molecular Biology*, 256(3), 590-600.

Baburina, I.; G. Dikdan; F. Guo; G. I. Tous; B. Root and F. Jordan. (1998). "Reactivity at the substrate activation site of yeast pyruvate decarboxylase: Inhibition by distortion of domain interactions." *Biochemistry*, 37(5), 1245-1255.

Baldascini, H. and D. B. Janssen. (2005). "Interfacial inactivation of epoxide hydrolase in a two-liquid-phase system." *Enzyme and Microbial Technology*, 36(2-3), 285-293.

Barta, T. E.; M. A. Stealey; R. M. Weier and P. W. Collins. (1998). "Synthesis and pharmacological activity of some 4,5-diarylimidazole COX-2 inhibitors." *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 216, 301-MEDI.

Bender, P. E.; D. T. Hill; P. H. Offen; K. Razgaitis; P. Lavanchy; O. D. Stringer; B. M. Sutton; D. E. Griswold; M. Dimartino; D. T. Walz, et al. (1985). "5,6-diaryl-2,3-dihydroimidazo 2,1-b thiazoles - A new class of immunoregulatory antiinflammatory agents." *Journal of Medicinal Chemistry*, 28(9), 1169-1177.

Berger, B. and K. Faber. (1991). "Immunization of lipase against acetaldehyde emerging in acyl transfer-reactions from vinyl-acetate." *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, (17), 1198-1200.

Berthold, C. L.; D. Gocke; D. Wood; F. J. Leeper; M. Pohl and G. Schneider. (2007). "Structure of the branched-chain keto acid decarboxylase (KdcA) from *Lactococcus lactis*

provides insights into the structural basis for the chemoselective and enantioselective carbonylation reaction." *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 63, 1217-1224.

Brandt, G. S.; M. M. Kneen; S. Chakraborty; A. T. Baykal; N. Nemeria; A. Yep; D. I. Ruby; G. A. Petsko; G. L. Kenyon; M. J. McLeish, et al. (2009). "Snapshot of a Reaction Intermediate: Analysis of Benzoylformate Decarboxylase in Complex with a Benzoylphosphonate Inhibitor." *Biochemistry*, 48(15), 3247-3257.

Brandt, G. S.; N. Nemeria; S. Chakraborty; M. J. McLeish; A. Yep; G. L. Kenyon; G. A. Petsko; F. Jordan and D. Ringe. (2008). "Probing the active center, of benzaldehyde lyase with substitutions and the pseudosubstrate analogue benzoylphosphonic acid methyl ester." *Biochemistry*, 47(29), 7734-7743.

Breslow, R. (1957). "The Mechanism of Thiamine Action. 2. Rapid Deuterium Exchange in Thiazolium Salts." *Journal of the American Chemical Society*, 79(7), 1762-1763.

Breslow, R. (1958). "On the mechanism of thiamine action: IV. Evidence from studies on model systems." *Journal of the American Chemical Society*, 80(14), 3719-3726.

Breuer, M.; M. Pohl; B. Hauer and B. Lingen. (2002). "High-throughput assay of (R)-phenylacetylcarbinol synthesized by pyruvate decarboxylase." *Anal. Bioanal. Chem.*, 374(6), 1069-1073.

Brosi, H. (2006) "Klonierung und Charakterisierung neuer Thiamindiphosphat-abhängiger Enzyme" Heinrich-Heine Universität, Diplomarbeit.

Buko, V. U.; A. A. Artsukevich and K. V. Ignatenko. (1999). "Aldehydic products of lipid peroxidation inactivate cytochrome P-450." *Experimental and Toxicologic Pathology*, 51(4-5), 294-298.

Carrea, G. (1984). "Biocatalysis in water-organic solvent 2-phase systems." *Trends in Biotechnology*, 2(4), 102-106.

Carrea, G. and S. Riva. (2000). "Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents." *Angew Chem Int Ed Engl*, 39(13), 2226-2254.

Carvalho, C. M. L. and J. M. S. Cabral. (2000). "Reverse micelles as reaction media for lipases." *Biochimie*, 82(11), 1063-1085.

Castro, G. R. and T. Knubovets. (2003). "Homogeneous biocatalysis in organic solvents and water-organic mixtures." *Critical Reviews in Biotechnology*, 23(3), 195-231.

Caussette, M.; A. Gaunand; H. Planche; S. Colombie; P. Monsan and B. Lindet. (1999). "Lysozyme inactivation by inert gas bubbling: Kinetics in a bubble column reactor." *Enzyme and Microbial Technology*, 24(7), 412-418.

Colombie, S.; A. Gaunand and B. Lindet. (2001). "Lysozyme inactivation under mechanical stirring: effect of physical and molecular interfaces." *Enzyme and Microbial Technology*, 28(9-10), 820-826.

Costelloe, S. J.; J. M. Ward and P. A. Dalby. (2008). "Evolutionary analysis of the TPP-dependent enzyme family." *Journal of Molecular Evolution*, 66(1), 36-49.

Demir, A. S.; M. Pohl; E Janzen and M. Müller. (2001). "Enantioselective synthesis of hydroxy ketones through cleavage and formation of acyloin linkage. Enzymatic kinetic resolution via C–C bond cleavage." *J Chem Soc Perkin Trans 1*, (7), 633-635.

Demir, A. S.; O. Sesenoglu; E. Eren; B. Hosrik; M. Pohl; E. Janzen; D. Kolter; R. Feldmann; P. Dünkermann and M. Müller. (2002). "Enantioselective synthesis of alpha-hydroxy ketones via benzaldehyde lyase-catalyzed C-C bond formation reaction." *Advanced Synthesis & Catalysis*, 344(1), 96-103.

Di Lorenzo, M.; A. Hidalgo; R. Molina; J. A. Hermoso; D. Pirozzi and U. T. Bornscheuer. (2007). "Enhancement of the stability of a prolipase from *Rhizopus oryzae* toward aldehydes by saturation mutagenesis." *Appl Environ Microbiol*, 73(22), 7291-7299.

Dobritsch, D.; S. König; G. Schneider and G. G. Lu. (1998). "High resolution crystal structure of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis* - Implications for substrate activation in pyruvate decarboxylases." *Journal of Biological Chemistry*, 273(32), 20196-20204.

Domínguez de María, P.; T. Stillger; M. Pohl; S. Wallert; K. Drauz; H. Gröger; H. Trauthwein and A. Liese. (2006). "Preparative enantio selective synthesis of benzoin and (R)-2-hydroxy-1-phenylpropanone using benzaldehyde lyase." *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 38(1), 43-47.

Donohue, T. M.; D. J. Tuma and M. F. Sorrell. (1983). "Acetaldehyde adducts with proteins - Binding of [¹⁴C]-labeled acetaldehyde to serum-albumin." *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 220(1), 239-246.

Drauz, Karlheinz and Herbert Waldmann. (2002). *Enzyme catalysis in organic synthesis: A comprehensive handbook, Volume III, 2nd Edition.*

Duggleby, R. G. (2006). "Domain relationships in thiamine diphosphate-dependent enzymes." *Accounts of Chemical Research*, 39(8), 550-557.

Dünkermann, P.; D. Kolter-Jung; A. Nitsche; A. S. Demir; P. Siegert; B. Lingen; M. Baumann; M. Pohl and M. Müller. (2002). "Development of a donor-acceptor concept for enzymatic cross-coupling reactions of aldehydes: The first asymmetric cross-benzoin condensation." *Journal of the American Chemical Society*, 124(41), 12084-12085.

Dünkermann, P.; M. Pohl and M. Müller. (2004). "Enantiomerically pure 2-hydroxy carbonyl compounds through enzymatic C-C bond formation." *Chimica Oggi/Chemistry Today supplement Chiral Catalysis*, 22(11/12), 24-28.

Dünnwald, T.; A. S. Demir; P. Siegert; M. Pohl and M. Müller. (2000). "Enantioselective synthesis of (S)-2-hydroxypropanone derivatives by benzoylformate decarboxylase catalyzed C-C bond formation." *European Journal of Organic Chemistry*, (11), 2161-2170.

- Dyda, F.; W. Furey; S. Swaminathan; M. Sax; B. Farrenkopf and F. Jordan. (1993).** "Catalytic centers in the thiamin diphosphate dependent enzyme pyruvate decarboxylase at 2.4-Å resolution." *Biochemistry*, 32(24), 6165-6170.
- Eckstein, M. F.; J. Lembrecht; J. Schumacher; W. Eberhard; A. C. Spiess; M. Peters; C. Roosen; L. Greiner; W. Leitner and U. Kragl. (2006).** "Maximise equilibrium conversion in biphasic catalysed reactions: How to obtain reliable data for equilibrium constants?" *Adv. Synth. Catal.*, 348(12-13), 1597-1604.
- Eggers, D. K.; H. W. Blanch and J. M. Prausnitz. (1989).** "Extractive catalysis-Solvent effects on equilibria of enzymatic-reactions in 2-phase systems." *Enzyme and Microbial Technology*, 11(2), 84-89.
- Enders, D.; K. Breuer and J. H. Teles. (1996).** "A novel asymmetric benzoin reaction catalyzed by a chiral triazolium salt - Preliminary Communication." *Helvetica Chimica Acta*, 79(4), 1217-1221.
- Enders, D. and U. Kallfass. (2002).** "An efficient nucleophilic carbene catalyst for the asymmetric benzoin condensation." *Angewandte Chemie-International Edition*, 41(10), 1743-+.
- Eyzaguirre, J. (1996).** "An overview on chemical modification of enzymes. The use of group-specific reagents." *Biol Res*, 29(1), 1-11.
- Faber, K. (1994).** *Biotransformation in Organic Chemistry, 2nd Edition*. Springer Verlag.
- Fagain, C. O. (1995).** "Understanding and increasing protein stability." *Biochim. Biophys. Acta*, 1252(1), 1-14.
- Fan, K. K.; P. Ouyang; X. Wu and Z. H. Lu. (2001).** "A Model of Interfacial Inactivation for Papain in Aqueous Organic Biphasic Systems." *Enzyme and Microbial Technology*, 28(1), 3-7.
- Fang, Q.F.; Z. Han; P. Grover; D. Kessler; C.H. Senanayake and S.A. Wald. (2000).** "Rapid access to enantiopure bupropion and its major metabolite by stereospecific nucleophilic substitution on an α -ketotriflate." *Tetrahedron: Asymmetry*, 11, 3659-3663.
- Flora, K.; M. Hahn; H. Rosen and K. Benner. (1998).** "Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease." *Am J Gastroenterol*, 93(2), 139-143.
- Frank, R. A.; J. V. Pratap; X. Y. Pei; R. N. Perham and B. F. Luisi. (2005).** "The molecular origins of specificity in the assembly of a multienzyme complex." *Structure*, 13(8), 1119-1130.
- Frank, R. A. W.; F. J. Leeper and B. F. Luisi. (2007).** "Structure, mechanism and catalytic duality of thiamine-dependent enzymes." *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(7-8), 892-905.
- Franken, B. (2008)** "Untersuchungen zum Inaktivierungsmechanismus von mikrobiellen Lipasen in wasserfreien Transesterifizierungen" Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Dissertation.

Frant, M., S. (1995). "How to Measure pH in Mixed & Nonaqueous Solutions." *Today's Chemist at Work, American Chemical Society*, 39-42.

Gala, D. and D. J. DiBenedetto. (1997). "Metal salts induced improved α -hydroxylation of ketones for the preparation of the key chiral intermediate ofazole antifungals." *Tetrahedron-Asymmetry*, 8(18), 3047-3050.

Gala, D.; D. J. DiBenedetto; J. E. Clark; B. L. Murphy; D. P. Schumacher and M. Steinman. (1996a). "Preparations of antifungal Sch 42427/SM 9164: Preparative chromatographic resolution, and total asymmetric synthesis via enzymatic preparation of chiral α -hydroxy arylketones." *Tetrahedron Letters*, 37(5), 611-614.

Gala, D.; D. J. DiBenedetto; I. Mergelsberg and M. Kugelman. (1996b). "Total chiral synthesis ofazole antifungals via α -hydroxylation of ketones." *Tetrahedron Letters*, 37(45), 8117-8120.

Ghatorae, A. S.; G. Bell and P. J. Halling. (1994a). "Inactivation of enzymes by organic-solvents - New technique with well-defined interfacial area." *Biotechnology and Bioengineering*, 43(4), 331-336.

Ghatorae, A. S.; M. J. Guerra; G. Bell and P. J. Halling. (1994b). "Immiscible organic-solvent inactivation of urease, chymotrypsin, lipase, and ribonuclease - Separation of dissolved solvent and interfacial effects." *Biotechnology and Bioengineering*, 44(11), 1355-1361.

Giovannini, P. P.; P. Pedrini; V. Venturi; G. Fantin and A. Medici. (2010). "*Bacillus stearothermophilus* acetylacetoin synthase: A new catalyst for C-C bond formation." *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 64(1-2), 113-117.

Gocke, D. (2007) "New and optimised thiamine diphosphate (ThDP)-dependent enzymes for carbologation - Creation of a toolbox for chiral 2-hydroxy ketones" Heinrich-Heine Universität, Dissertation.

Gocke, D.; C. L. Nguyen; M. Pohl; T. Stillger; L. Walter and M. Müller. (2007). "Branched-chain keto acid decarboxylase from *Lactococcus lactis* (KdcA), a valuable thiamine diphosphate-dependent enzyme for asymmetric C-C bond formation." *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349(8-9), 1425-1435.

Gocke, D.; L. Walter; E. Gauchenova; G. Kolter; M. Knoll; C. L. Berthold; G. Schneider; J. Pleiss; M. Muller and M. Pohl. (2008). "Rational protein design of ThDP-Dependent enzymes-engineering stereoselectivity." *Chembiochem*, 9(3), 406-412.

González, B.; A. Merino; M. Almeida and R. Vicuña. (1986). "Comparative Growth of Natural Bacterial Isolates on Various Lignin-Related Compounds." *Applied and Environmental Microbiology*, 52(6), 1428-1432.

González, B. and R. Vicuña. (1989). "Benzaldehyde Lyase, a Novel Thiamine Ppi-Requiring Enzyme, from *Pseudomonas fluorescens* Biovar-I." *Journal of Bacteriology*, 171(5), 2401-2405.

- Griebenow, K.; M. Vidal; C. Baez; A. M. Santos and G. Barletta. (2001).** "Nativelike enzyme properties are important for optimum activity in neat organic solvents." *Journal of the American Chemical Society*, 123(22), 5380-5381.
- Hachisu, Y.; J.W. Bode and K. Suzuki. (2003).** "Catalytic intramolecular crossed aldehyde-ketone benzoin reaction: A novel synthesis of functionalized preanthraquinones." *Journal of the American Chemical Society*, 125, 8432-8433.
- Halling, P. J. (1987).** "Biocatalysis in multiphase reaction mixtures containing organic liquids." *Biotechnology Advances*, 5(1), 47-84.
- Halling, P. J. (1990).** "Solvent selection for biocatalysis in mainly organic-systems - Predictions of effects on equilibrium position." *Biotechnology and Bioengineering*, 35(7), 691-701.
- Halling, P. J. (2004).** "What can we learn by studying enzymes in non-aqueous media?" *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 359(1448), 1287-1296; discussion 1296-1287, 1323-1288.
- Harris, N. V.; C. Smith; M. J. Ashton; A. W. Bridge; R. C. Bush; E. C. J. Coffee; D. I. Dron; M. F. Harper; D. J. Lythgoe; C. G. Newton, *et al.* (1992).** "Acyl-CoA-Cholesterol C-acyl Transferase (Acat) Inhibitors .1. 2-(Alkylthio)-4,5-Diphenyl-1h-Imidazoles as Potent Inhibitors of Acat." *Journal of Medicinal Chemistry*, 35(23), 4384-4392.
- Hashiyama, T.; K. Morikawa and K. B. Sharpless. (1992).** "Alpha-Hydroxy Ketones in High Enantiomeric Purity from Asymmetric Dihydroxylation of Enol Ethers." *Journal of Organic Chemistry*, 57(19), 5067-5068.
- Hasson, M. S.; A. Muscate; G. T. Henahan; P. F. Guidinger; G. A. Petsko; D. Ringe and G. L. Kenyon. (1995).** "Purification and crystallization of benzoylformate decarboxylase." *Protein Sci*, 4(5), 955-959.
- Hasson, M. S.; A. Muscate; M. J. McLeish; L. S. Polovnikova; J. A. Gerlt; G. L. Kenyon; G. A. Petsko and D. Ringe. (1998).** "The crystal structure of benzoylformate decarboxylase at 1.6 angstrom resolution: Diversity of catalytic residues in thiamin diphosphate-dependent enzymes." *Biochemistry*, 37(28), 9918-9930.
- Hawkins, C. F.; A. Borges and R. N. Perham. (1989).** "A Common Structural Motif in Thiamin Pyrophosphate-Binding Enzymes." *Febs Letters*, 255(1), 77-82.
- Haynes, C. A. and W. Norde. (1995).** "Structures and stabilities of adsorbed proteins." *Journal of Colloid and Interface Science*, 169(2), 313-328.
- Hegeman, G. D. (1970).** "Benzoylformate decarboxylase (*Pseudomonas putida*)." *Methods Enzymol.*, 17A, 674-678.
- Henning, H.; C. Leggewie; M. Pohl; M. Müller; T. Eggert and K. E. Jaeger. (2006).** "Identification of novel benzoylformate decarboxylases by growth selection." *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7510-7517.
- Hermanson, Greg T. (1995).** *Bioconjugate Techniques*. Academic Press.

Hildebrand, F.; S. Kühl; M. Pohl; D. Vasic-Racki; M. Müller; C. Wandrey and S. Lütz. (2007). "The production of (*R*)-2-hydroxy-1-phenyl-propan-1-one derivatives by benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens* in a continuously operated membrane reactor." *Biotechnology and Bioengineering*, 96(5), 835-843.

Hischer, T.; D. Gocke; M. Fernandez; P. Hoyos; A. R. Alcantara; J. V. Sinisterra; W. Hartmeier and M. B. Ansorge-Schumacher. (2005). "Stereoselective synthesis of novel benzoin catalysed by benzaldehyde lyase in a gel-stabilised two-phase system." *Tetrahedron*, 61(31), 7378-7383.

Hochuli, E. (1988). "Large-Scale Chromatography of Recombinant Proteins." *Journal of Chromatography*, 444, 293-302.

Hoyos, P.; J. V. Sinisterra; F. Molinari; A. R. Alcantara and P. Dominguez de Maria. (2010). "Biocatalytic strategies for the asymmetric synthesis of alpha-hydroxy ketones." *Acc Chem Res*, 43(2), 288-299.

Hübner, G.; S. König; A. Schellenberger and M. H. J. Koch. (1990). "An X-ray solution scattering study of the cofactor and activator induced structural-changes in yeast pyruvate decarboxylase (PDC)." *Febs Letters*, 266(1-2), 17-20.

Hutcheon, G. A.; M. C. Parker and B. D. Moore. (2000). "Measuring enzyme motility in organic media using novel H-D exchange methodology." *Biotechnology and Bioengineering*, 70(3), 262-269.

Iding, H.; T. Dünwald; L. Greiner; A. Liese; M. Müller; P. Siegert; J. Grötzinger; A. S. Demir and M. Pohl. (2000). "Benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* as stable catalyst for the synthesis of chiral 2-hydroxy ketones." *Chemistry-a European Journal*, 6(8), 1483-1495.

James, L. C. and D. S. Tawfik. (2003). "Conformational diversity and protein evolution - A 60-year-old hypothesis revisited." *Trends in Biochemical Sciences*, 28(7), 361-368.

Janknecht, R.; G. Demartynoff; J. Lou; R. A. Hipkind; A. Nordheim and H. G. Stunnenberg. (1991). "Rapid and Efficient Purification of Native Histidine-Tagged Protein Expressed by Recombinant Vaccinia Virus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(20), 8972-8976.

Janzen, E (2002) "Die Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens*" Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Dissertation.

Janzen, E.; M. Müller; D. Kolter-Jung; M. M. Kneen; M. J. McLeish and M. Pohl. (2006). "Characterization of benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens*: A versatile enzyme for asymmetric C-C bond formation." *Bioorganic Chemistry*, 34(6), 345-361.

Jennewein, S.; M. Schurmann; M. Wolberg; I. Hilker; R. Luiten; M. Wubbolts and D. Mink. (2006). "Directed evolution of an industrial biocatalyst: 2-deoxy-D-ribose 5-phosphate aldolase." *Biotechnol J*, 1(5), 537-548.

- Jordan, F. (2003).** "Current mechanistic understanding of thiamin diphosphate-dependent enzymatic reactions." *Natural Product Reports*, 20(2), 184-201.
- Jordan, F.; Z. Zhang and E. Sergienko. (2002).** "Spectroscopic evidence for participation of the 1',4'-imino tautomer of thiamin diphosphate in catalysis by yeast pyruvate decarboxylase." *Bioorganic Chemistry*, 30(3), 188-198.
- Takeya, H.; M. Morishita; H. Koshino; T. Morita; K. Kobayashi and H. Osada. (1999).** "Cytosazone: A novel cytokine modulator containing a 2-oxazolidinone ring produced by *Streptomyces sp.*" *Journal of Organic Chemistry*, 64(3), 1052-1053.
- Kazandjian, R. Z. and A. M. Klibanov. (1985).** "Regioselective oxidation of phenols catalyzed by polyphenol oxidase in chloroform." *Journal of the American Chemical Society*, 107(19), 5448-5450.
- Kern, D.; G. Kern; H. Neef; K. Tittmann; M. Killenberg-Jabs; C. Wikner; G. Schneider and G. Hubner. (1997).** "How thiamine diphosphate is activated in enzymes." *Science*, 275(5296), 67-70.
- Khalifa, F. A.; N. A. Ismail; A. H. H. Elghandour and H. F. Zohdi. (1991).** "Benzoin in Heterocyclic Synthesis - Synthesis and Reactions of 4-Cyano-2,3-Diphenyl-2h-Pyrrol-5-Thione." *Tetrahedron*, 47(38), 8243-8250.
- Khmelnitsky, Y. L.; A. B. Belova; A. V. Levashov and V. V. Mozhaev. (1991a).** "Relationship between surface hydrophilicity of a protein and its stability against denaturation by organic-solvents." *Febs Letters*, 284(2), 267-269.
- Khmelnitsky, Y. L.; V. V. Mozhaev; A. B. Belova; M. V. Sergeeva and K. Martinek. (1991b).** "Denaturation capacity - A new quantitative criterion for selection of organic-solvents as reaction media in biocatalysis." *European Journal of Biochemistry*, 198(1), 31-41.
- Kihumbu, D.; T. Stillger; W. Hummel and A. Liese. (2002).** "Enzymatic synthesis of all stereoisomers of 1-phenylpropane-1,2-diol." *Tetrahedron-Asymmetry*, 13(10), 1069-1072.
- Kijima, T.; Y. Yaginuma and T. Izumi. (1999).** "Enzymatic synthesis of optically active ferrocenes by immobilized lipase from *Candida Antarctica*." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74(6), 501-508.
- Kim, M. J.; M. Y. Choi; J. K. Lee and Y. Ahn. (2003).** "Enzymatic selective acylation of glycosides in ionic liquids: Significantly enhanced reactivity and regioselectivity." *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 26(3-6), 115-118.
- Kim, P. Y.; D. J. Pollard and J. M. Woodley. (2007).** "Substrate supply for effective biocatalysis." *Biotechnol Prog*, 23(1), 74-82.
- Kitazaki, T.; A. Tasaka; H. Hosono; Y. Matsushita and K. Itoh. (1999).** "Optically active antifungal azoles. VIII. Synthesis and antifungal activity of 1-[(1*R*,2*R*)-2-(2,4-difluoro- and 2-fluorophenyl)-2-hydroxy-1-methyl-3-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)propyl]-3-(4-substituted phenyl)-2(1*H*,3*H*)-imidazolones and 2-imidazolidinones." *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 47(3), 351-359.

- Klibanov, A. M. (1997).** "Why are enzymes less active in organic solvents than in water?" *Trends Biotechnol*, 15(3), 97-101.
- Klibanov, A. M. (2001).** "Improving enzymes by using them in organic solvents." *Nature*, 409(6817), 241-246.
- Kluger, R. and K. Tittmann. (2008).** "Thiamin diphosphate catalysis: Enzymic and nonenzymic covalent intermediates." *Chemical Reviews*, 108(6), 1797-1833.
- Knight, R. L. and F. J. Leeper. (1998).** "Comparison of chiral thiazolium and triazolium salts as asymmetric catalysts for the benzoin condensation." *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*, (12), 1891-1893.
- Knoll, M.; M. Muller; J. Pleiss and M. Pohl. (2006).** "Factors mediating activity, selectivity, and substrate specificity for the thiamin diphosphate-dependent enzymes benzaldehyde lyase and benzoylformate decarboxylase." *Chembiochem*, 7(12), 1928-1934.
- Kocot, C. (2010)** "Untersuchung von Einflussfaktoren auf die Carboligaseaktivität ThDP-abhängiger Enzyme" Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Diplomarbeit.
- Kokova, M. (2009)** "Characterization of benzaldehyde lyase and benzoylformate decarboxylase in non-conventional media" Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Dissertation.
- Kokova, M.; M. Zavrel; K. Tittmann; A. C. Spiess and M. Pohl. (2009).** "Investigation of the carboligase activity of thiamine diphosphate-dependent enzymes using kinetic modeling and NMR spectroscopy." *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 61(1-2), 73-79.
- Kolter, G. (2009)** "Neue Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme für die Synthese enantiokomplementärer 2-Hydroxyketone" Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Dissertation.
- Kondo, A.; S. Oku and K. Higashitani. (1991).** "Structural-changes in protein molecules adsorbed on ultrafine silica particles." *Journal of Colloid and Interface Science*, 143(1), 214-221.
- König, S. (1998).** "Subunit structure, function and organisation of pyruvate decarboxylases from various organisms." *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1385(2), 271-286.
- Korz, D.J.; U. Rinas; K. Hellmuth; E.A. Sanders and W.-D. Deckwer. (1995).** "Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*." *J. Biotechnol.*, 39, 59-65.
- Kragl, U.; M. Eckstein and N. Kaftzik. (2002).** "Enzyme catalysis in ionic liquids." *Current Opinion in Biotechnology*, 13(6), 565-571.
- Krishna, S. H. (2002).** "Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media." *Biotechnology Advances*, 20(3-4), 239-267.

Kühl, S. (2009) "Enzymkatalysierte C-C Knüpfung: Reaktionstechnische Untersuchungen zur Synthese pharmazeutischer Intermediate" Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Dissertation.

Kühl, S.; D. Zehentgruber; M. Pohl; M. Müller and S. Lütz. (2007). "Process development for enzyme catalysed asymmetric C-C-bond formation." *Chemical Engineering Science*, 62(18-20), 5201-5205.

Kumar, P. Ramesh and V. Prakash. (2003). "Stabilization of structure of monomeric and multimeric proteins - role of cosolvents." *Proc. Indian Natl. Sci. Acad., Part B*, 69(4), 371-391.

Kutter, S.; G. Wille; S. Relle; M. S. Weiss; G. Hübner and S. König. (2006). "The crystal structure of pyruvate decarboxylase from *Kluyveromyces lactis*." *Febs Journal*, 273(18), 4199-4209.

Kuzmic, P.; A. G. Peranteau; C. GarciaEcheverria and D. H. Rich. (1996). "Mechanical Effects on the Kinetics of the Hiv Proteinase Deactivation." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 221(2), 313-17.

Lakowicz, J. R. (1999). *Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd Edition*. Springer Verlag.

Lantos, I.; P. E. Bender; K. A. Razgaitis; B. M. Sutton; M. J. DiMartino; D. E. Griswold and D. T. Walz. (1984). "Antiinflammatory activity of 5,6-diaryl-2,3-dihydroimidazo[2,1-b]thiazoles. Isomeric 4-pyridyl and 4-substituted phenyl derivatives." *J Med Chem*, 27(1), 72-75.

Leblanc, Y.; J. Y. Gauthier; D. Ethier; J. Guay; J. Mancini; D. Riendeau; P. Tagari; P. Vickers; E. Wong and P. Prasit. (1995). "Synthesis and Biological Evaluation of 2,3-Diarylthiophenes as Selective Cox-2 and Cox-1 Inhibitors." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 5(18), 2123-2128.

Ledl, F. and E. Schleicher. (1990). "New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human-body." *Angewandte Chemie-International Edition*, 29(6), 565-594.

Lee, L. G. and G. M. Whitesides. (1986). "Preparation of optically-active 1,2-diols and α -hydroxy ketones using glycerol dehydrogenase as catalyst - Limits to enzyme-catalyzed synthesis due to noncompetitive and mixed inhibition by product." *Journal of Organic Chemistry*, 51(1), 25-36.

Lindqvist, Y.; G. Schneider; U. Ermler and M. Sundstrom. (1992). "3-dimensional structure of transketolase, a thiamine diphosphate dependent enzyme, at 2.5 Å resolution." *Embo Journal*, 11(7), 2373-2379.

Lingen, B.; J. Grötzinger; D. Kolter; M. R. Kula and M. Pohl. (2002). "Improving the carbolligase activity of benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* by a combination of directed evolution and site-directed mutagenesis." *Protein Engineering*, 15(7), 585-593.

- Liu, Wenfang and Ping Wang. (2007).** "Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis." *Biotechnol. Adv.*, 25(4), 369-384.
- Lu, G. G.; D. Dobritzsch; S. Baumann; G. Schneider and S. König. (2000).** "The structural basis of substrate activation in yeast pyruvate decarboxylase - A crystallographic and kinetic study." *European Journal of Biochemistry*, 267(3), 861-868.
- Maa, Y. F. and C. C. Hsu. (1996).** "Effect of High Shear on Proteins." *Biotechnology and Bioengineering*, 51(4), 458-65.
- Maa, Y. F. and C. C. Hsu. (1997).** "Protein Denaturation by Combined Effect of Shear and Air-Liquid Interface." *Biotechnology and Bioengineering*, 54(6), 503-12.
- Malinowski, J. J. (2001).** "Two-phase partitioning bioreactors in fermentation technology." *Biotechnology Advances*, 19(7), 525-538.
- Maraite, A.; T. Schmidt; M. B. Ansorge-Schumacher; A. M. Brzozowski and G. Grogan. (2007).** "Structure of the ThDP-dependent enzyme benzaldehyde lyase refined to 1.65 angstrom resolution." *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications*, 63, 546-548.
- Mattos, C. and D. Ringe. (2001).** "Proteins in organic solvents." *Current Opinion in Structural Biology*, 11(6), 761-764.
- McGuffee, S. R. and A. H. Elcock. (2010).** "Diffusion, Crowding & Protein Stability in a Dynamic Molecular Model of the Bacterial Cytoplasm." *Plos Computational Biology*, 6(3).
- Meanwell, N. A.; M. J. Rosenfeld; J. J. K. Wright; C. L. Brassard; J. O. Buchanan; M. E. Federici; J. S. Fleming and S. M. Seiler. (1992).** "Structure-activity-relationships associated with 3,4,5-triphenyl-1h-pyrazole-1-nonanoic acid, a nonprostanoid prostacyclin mimetic." *Journal of Medicinal Chemistry*, 35(2), 389-397.
- Metz, B.; G. F. A. Kersten; P. Hoogerhout; H. F. Brugghe; H. A. M. Timmermans; A. de Jong; H. Meiring; J. ten Hove; W. E. Hennink; D. J. A. Crommelin, *et al.* (2004).** "Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins - Reactions with model peptides." *Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 6235-6243.
- Mikolajek, R. J.; A. C. Spiess; M. Pohl and J. Buchs. (2009).** "Propioin Synthesis Using Thiamine Diphosphate-Dependent Enzymes." *Biotechnology Progress*, 25(1), 132-138.
- Mikolajek, R.; A. C. Spiess and J. Buchs. (2007).** "Feasibility of gas/solid carboligation: Conversion of benzaldehyde to benzoin using thiamine diphosphate-dependent enzymes." *Journal of Biotechnology*, 129(4), 723-725.
- Morazzoni, R. and E. Bombardelli. (1965).** "*Silybum marianum* (*Carduus marianus*)."
Fitoterapia, 66, 3-42.
- Mosbacher, T. G.; M. Müller and G. E. Schulz. (2005).** "Structure and mechanism of the ThDP-dependent benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens*." *Febs Journal*, 272(23), 6067-6076.

- Mozhaev, V. V.; Y. L. Khmelnitsky; M. V. Sergeeva; A. B. Belova; N. L. Klyachko; A. V. Levashov and K. Martinek. (1989).** "Catalytic activity and denaturation of enzymes in water organic cosolvent mixtures - α -chymotrypsin and laccase in mixed water alcohol, water glycol and water formamide solvents." *European Journal of Biochemistry*, 184(3), 597-602.
- Müller, M.; D. Gocke and M. Pohl. (2009).** "Thiamin diphosphate in biological chemistry: Exploitation of diverse thiamin diphosphate-dependent enzymes for asymmetric chemoenzymatic synthesis." *Febs Journal*, 276(11), 2894-2904.
- Müller, Y. A.; Y. Lindqvist; W. Furey; G. E. Schulz; F. Jordan and G. Schneider. (1993).** "A thiamin diphosphate binding fold revealed by comparison of the crystal structures of transketolase, pyruvate oxidase and pyruvate decarboxylase." *Structure*, 1(2), 95-103.
- Nakamura, K.; M. Kinoshita and A. Ohno. (1995).** "Structure of solvent affects enantioselectivity of lipase-catalyzed transesterification." *Tetrahedron*, 51(32), 8799-8808.
- Nemeria, N. S.; S. Chakraborty; A. Balakrishnan and F. Jordan. (2009).** "Reaction mechanisms of thiamin diphosphate enzymes: defining states of ionization and tautomerization of the cofactor at individual steps." *Febs Journal*, 276(9), 2432-2446.
- Norde, W. (1986).** "Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface." *Advances in Colloid and Interface Science*, 25(4), 267-340.
- Orlich, B. and R. Schomaecker. (1999).** "Enzymatic reduction of a less water-soluble ketone in reverse micelles with NADH regeneration." *Biotechnology and Bioengineering*, 65(3), 357-362.
- Patel, R. N. (2008).** "Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis." *Coordination Chemistry Reviews*, 252(5-7), 659-701.
- Pazhang, M.; K. Khajeh; B. Ranjbar and S. Hosseinkhani. (2006).** "Effects of water-miscible solvents and polyhydroxy compounds on the structure and enzymatic activity of thermolysin." *Journal of Biotechnology*, 127(1), 45-53.
- Peters, M.; M. F. Eckstein; G. Hartjen; A. C. Spiess; W. Leitner and L. Greiner. (2007).** "Exploring conversion of biphasic catalytic reactions: Analytical solution and parameter study." *Ind. Eng. Chem. Res.*, 46(22), 7073-7078.
- Peters, M.; M. Zavrel; J. Kahlen; T. Schmidt; M. Ansorge-Schurnacher; W. Leitner; J. Büchs; L. Greiner and A. C. Spiess. (2008).** "Systematic Approach to Solvent Selection for Biphasic Systems with a Combination of COSMO-RS and a Dynamic Modeling Tool." *Eng. Life Sci.*, 8(5), 546-552.
- Plietker, B. (2005).** "New oxidative pathways for the synthesis of α -hydroxy ketones - The α -hydroxylation and ketohydroxylation." *Tetrahedron-Asymmetry*, 16(21), 3453-3459.
- Pohl, M.; D. Gocke and M. Müller. (2009).** "Thiamine-Based Enzymes for Biotransformations.," P. T. Anastas and R. H. Crabtree, *Green Catalysis*. WILEY-VCH, 75 - 114.

- Pohl, M.; J. Grötzinger; A. Wollmer and M. R. Kula. (1994).** "Reversible dissociation and unfolding of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*." *European Journal of Biochemistry*, 224(2), 651-661.
- Pohl, M.; B. Lingen and M. Müller. (2002).** "Thiamin-diphosphate-dependent enzymes: New aspects of asymmetric C-C bond formation." *Chemistry-a European Journal*, 8(23), 5289-5295.
- Pohl, M.; G. A. Sprenger and M. Müller. (2004).** "A new perspective on thiamine catalysis." *Current Opinion in Biotechnology*, 15(4), 335-342.
- Pohlmann, C. (2007)** "Enzymkinetiken in Emulsionen" RWTH-Aachen, Diplomarbeit.
- Pollard, D. und Kosjek, B. (2008).** "Industrial-scale applications of enzymes in non-aqueous solvents.," G. Carrea and S. Riva, *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media*. VCH-Wiley, 310 pp.
- Polovnikova, E. S.; M. J. McLeish; E. A. Sergienko; J. T. Burgner; N. L. Anderson; A. K. Bera; F. Jordan; G. L. Kenyon and M. S. Hasson. (2003).** "Structural and kinetic analysis of catalysis by a thiamin diphosphate-dependent enzyme, benzoylformate decarboxylase." *Biochemistry*, 42(7), 1820-1830.
- Porath, J.; J. Carlsson; I. Olsson and G. Belfrage. (1975).** "Metal Chelate Affinity Chromatography, a New Approach to Protein Fractionation." *Nature*, 258(5536), 598-599.
- Procopiou, P. A.; C. D. Draper; J. L. Hutson; G. G. A. Inglis; B. C. Ross and N. S. Watson. (1993).** "Inhibitors of Cholesterol-Biosynthesis .2. 3,5-Dihydroxy-7-(n-Pyrrolyl)-6-Heptenoates, a Novel Series of Hmg-CoA Reductase Inhibitors." *Journal of Medicinal Chemistry*, 36(23), 3658-3662.
- Raj, K. C.; L. A. Talarico; L. O. Ingram and J. A. Maupin-Furrow. (2002).** "Cloning and characterization of the *Zymobacter palmae* pyruvate decarboxylase gene (pdc) and comparison to bacterial homologues." *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2869-2876.
- Remy, M. H.; C. Bourdillon and D. Thomas. (1985).** "Microenvironmental effects on enzyme catalysis. A kinetic study of hydrophobic derivatives of chymotrypsin." *Biochim. Biophys. Acta*, 829(1), 69-75.
- Reynen, M. and H. Sahm. (1988).** "Comparison of the structural genes for pyruvate decarboxylase in different *Zymomonas mobilis* strains." *Journal of Bacteriology*, 170(7), 3310-3313.
- Rosche, B.; M. Breuer; B. Hauer and P. L. Rogers. (2005a).** "Cells of *Candida utilis* for in vitro (R)-phenylacetylcarbinol production in an aqueous/octanol two-phase reactor." *Biotechnology Letters*, 27(8), 575-581.
- Rosche, B.; M. Breuer; B. Hauer and P. L. Rogers. (2005b).** "Role of pyruvate in enhancing pyruvate decarboxylase stability towards benzaldehyde." *Journal of Biotechnology*, 115(1), 91-99.

- Ross, A. C.; G. Bell and P. J. Halling. (2000a).** "Effect of pH on rate of interfacial inactivation of serine proteases in aqueous-organic systems." *Biotechnology and Bioengineering*, 67(4), 498-503.
- Ross, A. C.; G. Bell and P. J. Halling. (2000b).** "Organic solvent functional group effect on enzyme inactivation by the interfacial mechanism." *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 8(4-6), 183-192.
- Rouhi, A. M. (2003).** "Chirality at work." *Chemical & Engineering News*, 81(18), 56-61.
- Saehuan, C.; T. Rojanarata; S. Wiyakrutta; M. J. McLeish and V. Meeyootisom. (2007).** "Isolation and characterization of a benzoylformate decarboxylase and a NAD(+)/NADP(+)-dependent benzaldehyde dehydrogenase involved in D-phenylglycine metabolism in *Pseudomonas stutzeri* ST 201." *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 1770(11), 1585-1592.
- Schellenberger, A. (1998).** "Sixty years of thiamin diphosphate biochemistry." *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1385(2), 177-186.
- Schmidt, T. (2008)** "Experimentelle Analyse, Modellierung und biochemische Charakterisierung von Ein- und Zweiphasenreaktionen für die technische Biokatalyse" RWTH-Aachen, Dissertation.
- Schmidt, T.; M. Zavrel; A. Spiess and M. B. Ansorge-Schumacher. (2009).** "Biochemical peculiarities of benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens* Biovar I in the dependency on pH and cosolvent concentration." *Bioorganic Chemistry*, 37(1-3), 84-89.
- Schütz, A.; T. Sandalova; S. Ricagno; G. Hübner; S. König and G. Schneider. (2003).** "Crystal structure of thiamindiphosphate-dependent indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, an enzyme involved in the biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid." *European Journal of Biochemistry*, 270(10), 2312-2321.
- Sears, P.; K. Witte and C. H. Wong. (1999).** "The Effect of Counterion, Water Concentration, and Stirring on the Stability of Subtilisin Bpn ' in Organic Solvents." *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 6(3), 297-304.
- Shaanan, B. and D. M. Chipman. (2009).** "Reaction mechanisms of thiamin diphosphate enzymes: new insights into the role of a conserved glutamate residue." *Febs Journal*, 276(9), 2447-2453.
- Sheehan, J. C. and F. S. Guziec. (1972).** "4,5-diphenyl-4-oxazolin-2-one ring-system as an amine protecting group." *Journal of the American Chemical Society*, 94(18), 6561-&.
- Shin, W.; J. Pletcher; G. Blank and M. Sax. (1977).** "Ring Stacking Interactions between Thiamin and Planar Molecules as Seen in Crystal-Structure of a Thiamin Picrolonate Dihydrate Complex." *Journal of the American Chemical Society*, 99(10), 3491-3499.
- Siebert, P.; M. J. McLeish; M. Baumann; H. Iding; M. M. Kneen; G. L. Kenyon and M. Pohl. (2005).** "Exchanging the substrate specificities of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis* and benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida*." *Protein Engineering Design & Selection*, 18(7), 345-357.

Solladié-Cavallo, A.; P. Lupattelli; L. Jierry; P. Bovicelli; F. Angeli; R. Antonioletti and A. Klein. (2003). "Asymmetric oxidation of silyl enol ethers using chiral dioxiranes derived from alpha-fluoro cyclohexanones." *Tetrahedron Letters*, 44(34), 6523-6526.

Spiess, A. C.; W. Eberhard; M. Peters; M. F. Eckstein; L. Greiner and J. Büchs. (2008). "Prediction of partition coefficients using COSMO-RS: Solvent screening for maximum conversion in biocatalytic two-phase reaction systems." *Chem. Eng. Process.*, 47(6), 1034-1041.

Sprenger, G. A. and M. Pohl. (1999). "Synthetic potential of thiamin diphosphate-dependent enzymes." *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 6(3), 145-159.

Stanier, R.Y. and L.N. Ornston. (1973). "The b-Ketoadipate Pathway, pp 89 - 151," R. A.H. and T. D.W., *Advances in microbial physiology*. Academic Press Inc. (London),

Stermitz, F. R.; P. Lorenz; J. N. Tawara; L. A. Zenewicz and K. Lewis. (2000). "Synergy in a medicinal plant: Antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(4), 1433-1437.

Stillger, T. (2004) "Enantioselektive C-C Knüpfung mit Enzymen: Charakterisierung und reaktionstechnische Bearbeitung der Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* Biovar I" Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Dissertation.

Stillger, T.; M. Pohl; C. Wandrey and A. Liese. (2006). "Reaction engineering of benzaldehyde lyase catalyzing enantioselective C-C bond formation." *Org. Proc. Res. Develop.*, 10, 1172-1177.

Stinson, S. C. (1998). "Counting on chiral drugs." *Chemical & Engineering News*, 76(38), 83-+.

Stinson, S. C. (1999). "Chiral drug interactions." *Chemical & Engineering News*, 77(41), 101-120.

Straathof, A. J. J. (2003). "Enzymatic catalysis via liquid-liquid interfaces." *Biotechnology and Bioengineering*, 83(4), 371-375.

Stürmer, R. and M. Breuer. (2006). "Enzymes as catalysts - Chemistry and biology hand in hand." *Chemie in Unserer Zeit*, 40(2), 104-111.

Thomas, C. R. and P. Dunnill. (1979). "Action of Shear on Enzymes - Studies with Catalase and Urease." *Biotechnology and Bioengineering*, 21(12), 2279-302.

Thomas, C. R.; A. W. Nienow and P. Dunnill. (1979). "Action of Shear on Enzymes - Studies with Alcohol-Dehydrogenase." *Biotechnology and Bioengineering*, 21(12), 2263-78.

Tittmann, K. (2009). "Reaction mechanisms of thiamin diphosphate enzymes." *Febs Journal*, 276(9), 2431-2431.

Torchilin, V. P. and K. Martinek. (1979). "Enzyme stabilization without carriers." *Enzyme Microb. Technol.*, 1, 74-82.

Toth, S. I.; L. A. Smith and A. Ahmed. (2009). "Extreme Sensitivity of Botulinum Neurotoxin Domains Towards Mild Agitation." *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(9), 3302-11.

Tsou, A. Y.; S. C. Ransom; J. A. Gerlt; D. D. Buechter; P. C. Babbitt and G. L. Kenyon. (1990). "Mandelate Pathway of *Pseudomonas putida* - Sequence Relationships Involving Mandelate Racemase, (S)-Mandelate Dehydrogenase, and Benzoylformate Decarboxylase and Expression of Benzoylformate Decarboxylase in *Escherichia coli*." *Biochemistry*, 29(42), 9856-9862.

Uchida, K.; M. Kanematsu; Y. Morimitsu; T. Osawa; N. Noguchi and E. Niki. (1998). "Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction - Formation of free acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidized low density lipoproteins." *Journal of Biological Chemistry*, 273(26), 16058-16066.

van den Wittenboer, A. (2009) "Stabilitäten der Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* und der Carbonylreduktase aus *Candida parapsilosis* in wässrig-organischen Zweiphasensystemen" RWTH-Aachen, Dissertation.

van den Wittenboer, A.; T. Schmidt; P. Müller; M. B. Ansorge-Schumacher and L. Greiner. (2009). "Biphasic mini-reactor for characterization of biocatalyst performance." *Biotechnol J*, 4(1), 44-50.

Veit, T. (2004). "Biocatalysis for the production of cosmetic ingredients." *Engineering in Life Sciences*, 4(6), 508-511.

Vennestrøm, P. N. R.; C. H. Christensen; S. Pedersen; J. D. Grunwaldt and J. M. Woodley. (2010). "Next-Generation Catalysis for Renewables: Combining Enzymatic with Inorganic Heterogeneous Catalysis for Bulk Chemical Production." *Chemcatchem*, 2(3), 249-258.

Vermue, M. H. and J. Tramper. (1995). "Interrelations of chemistry and biotechnology .5. Biocatalysis in nonconventional media - Medium engineering aspects." *Pure and Applied Chemistry*, 67(2), 345-373.

Versées, W.; S. Spaepen; J. Vanderleyden and J. Steyaert. (2007). "The crystal structure of phenylpyruvate decarboxylase from *Azospirillum brasilense* at 1.5 angstrom resolution - Implications for its catalytic and regulatory mechanism." *Febs Journal*, 274(9), 2363-2375.

Viscidi, K. A.; M. P. Dougherty; J. Briggs and M. E. Camire. (2004). "Complex phenolic compounds reduce lipid oxidation in extruded oat cereals." *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie-Food Science and Technology*, 37(7), 789-796.

Ward, O. P. and A. Singh. (2000). "Enzymatic asymmetric synthesis by decarboxylases." *Current Opinion in Biotechnology*, 11(6), 520-526.

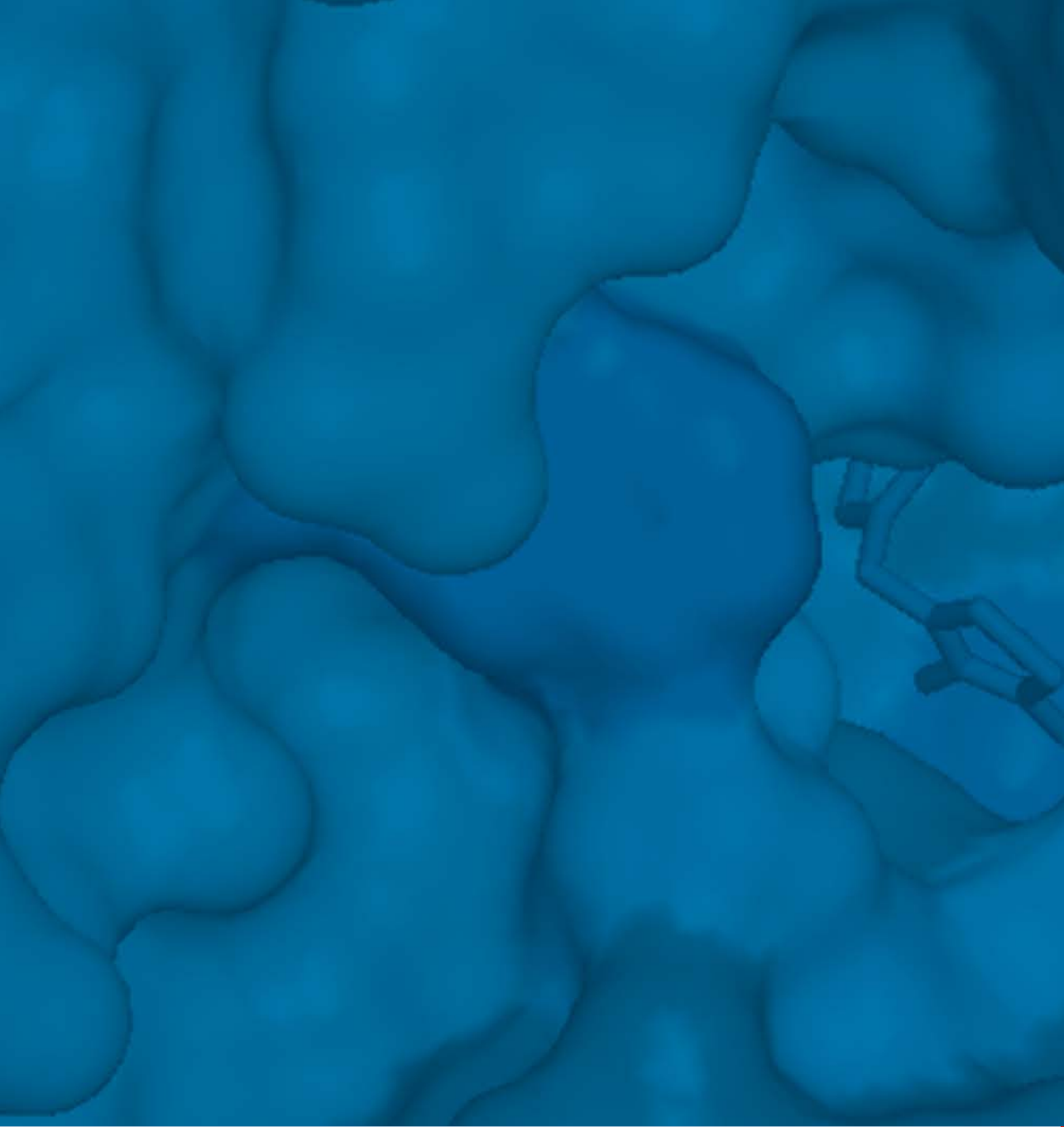
- Weber, H. K.; J. Zuegg; K. Faber and J. Pleiss. (1997).** "Molecular reasons for lipase-sensitivity against acetaldehyde." *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 3(1-4), 131-138.
- Wendorff, M. (2006)** "Neue Benzoylformiatdecarboxylasen für die Biokatalyse" Heinrich-Heine Universität, Dissertation.
- Whitesides, George M. and Chi Huey Wong. (1985).** "Enzymes in organic synthesis." *Angew. Chem.*, 97(8), 617-638.
- Widjaja, A.; T. H. Yeh and Y. H. Ju. (2008).** "Enzymatic Synthesis of Caffeic Acid Phenethyl Ester." *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 39(5), 413-18.
- Widmann, M.; R. Radloff and J. Pleiss. (2010).** "The Thiamine diphosphate dependent Enzyme Engineering Database: A tool for the systematic analysis of sequence and structure relations." *Bmc Biochemistry*, 11.
- Wohlgemuth, R. (2009).** "The locks and keys to industrial biotechnology." *New Biotechnology*, 25(4), 204-213.
- Zaks, A. and A. M. Klibanov. (1984).** "Enzymatic catalysis in organic media at 100 °C." *Science*, 224(4654), 1249-1251.
- Zaks, A. and A. M. Klibanov. (1986).** "Substrate-specificity of enzymes in organic-solvents vs. water is reversed." *Journal of the American Chemical Society*, 108(10), 2767-2768.
- Zaks, A. and A. M. Klibanov. (1988).** "The effect of water on enzyme action in organic media." *J. Biol. Chem.*, 263(17), 8017-8021.
- Zavrel, M. (2009)** "Model-based Experimental Analysis of Enzyme Kinetics in Aqueous-Organic Biphasic Systems" RWTH-Aachen, Dissertation.
- Zavrel, M.; T. Schmidt; C. Michalik; M. Ansorge-Schumacher; W. Marquardt; J. Buchs and A. C. Spiess. (2008).** "Mechanistic kinetic model for symmetric carboligations using benzaldehyde lyase." *Biotechnology and Bioengineering*, 101(1), 27-38.
- Zehentgruber, D. (2006)** "Reaktionstechnische Untersuchungen zur Benzoinsynthese: Entwicklung eines Reaktorkonzepts zur enantioselektiven Synthese von Benzoinen durch die Benzaldehydlyase" FH Campus Wien, Vienna Biocenter, Diplomarbeit.

1. **Methoden zur integrierten Analyse metabolischer Netzwerke unter stationären und instationären Bedingungen**
von S. A. Wahl (2008), 245 Seiten
ISBN: 978-3-89336-506-7
2. **Strukturelle Untersuchungen an membranassoziierten Proteinen: NMR-Strukturen des HIV-1 Virus Protein U (39-81) und des humanen CD4 (372-433)**
von M. Wittlich (2008), XVIII, 185 Seiten
ISBN: 978-3-89336-510-4
3. **Identifizierung von physiologischen und artifiziellen Liganden von GABARAP und Charakterisierung der resultierenden Interaktionen**
von J. Mohrlüder (2008), V, 158 Seiten
ISBN: 978-3-89336-511-1
4. **Struktur und Funktion von Transaminasen aus *Corynebacterium glutamicum***
von J. Marienhagen (2008), VI, 154 Seiten
ISBN: 978-3-89336-512-8
5. **Implementierung eines Funk-Protokolls (IEEE 802.15.4) und Entwicklung eines adaptiven Zeitsynchronisationsverfahrens für ein Netzwerk intelligenter und autarker Sensoren**
von M. Schlösser (2008), 77 Seiten
ISBN: 978-3-89336-519-7
6. **Etablierung und Optimierung der sekretorischen Gewinnung thermostabiler Lipasen in Gram-positiven Bakterien**
von H. Brundiek (2008), VIII, 154 Seiten
ISBN: 978-3-89336-520-3
7. **Visuospatial Attention: Neural Correlates and Pharmacological Modulation in Healthy Subjects and Patients with Spatial Neglect**
by S. Vossel (2008), XIV, 176 pages
ISBN: 978-3-89336-526-5
8. **Analyse des Substratspektrums der ClpCP-Protease aus *Corynebacterium glutamicum***
von J.-E. Schweitzer (2008), V, 130 Seiten
ISBN: 978-3-89336-528-9
9. **Adaptive Verfahren zur automatischen Bildverbesserung kernspintomographischer Bilddaten als Vorverarbeitung zur Segmentierung und Klassifikation individueller 3D-Regionen des Gehirns**
von J. Castellanos (2008), VI, 100 Seiten
ISBN: 978-3-89336-539-5

10. **Posttranslationale Regulation der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase in *Corynebacterium glutamicum***
von C. Schultz (2009), VII, 151 Seiten
ISBN: 978-3-89336-560-9
11. **MtrA, ein bifunktionaler Antwortregulator aus *Corynebacterium glutamicum***
von M. Brocker (2009), VI, 125 Seiten
ISBN: 978-3-89336-561-6
12. **Strukturelle Charakterisierung von GABRAP-Ligand-Interaktionen**
von Y. Thielmann (2009), 166 Seiten (getr. pag.)
ISBN: 978-3-89336-563-0
13. **Acceleration on an image reconstruction algorithm for Positron Emission Tomography using a Graphics Processing Unit**
by T. Felder (2009), 97 pages
ISBN: 978-3-89336-566-1
14. **NMR-Lösungsstruktur der Loopregion Tyr⁶⁷ - Leu⁷⁷ des visuellen Arrestins im Komplex mit photoaktiviertem Rhodopsin**
von S. Feuerstein (2009), XVI, 140 Seiten
ISBN: 978-3-89336-571-5
15. **Development of a Process for the Cleavage of a Mucin Fusion Protein by Enterokinase**
by T. Kubitzki (2009), IV, 133 pages
ISBN: 978-3-89336-575-3
16. **Children's health and RF EMF exposure**
project coord. P. Wiedemann (2009), 49 pages
ISBN: 978-3-89336-594-4
17. **Entwicklung einer Signalerfassungselektronik für eine Halbleiter-Photomultiplier (SiPM) Matrix**
von C. Parl (2009), IV, 128 Seiten
ISBN: 978-3-89336-595-1
18. **Medienorientierung biomedizinischer Forscher im internationalen Vergleich**
Die Schnittstelle von Wissenschaft & Journalismus und ihre politische Relevanz
herausg. von H. P. Peters (2009), 364 Seiten
ISBN: 978-3-89336-597-5
URN: urn:nbn:de: 0001-00542

19. **Identifizierung von Interaktionspartnern für HIV-1 Nef und ihre potentielle Relevanz bei der Entwicklung der HIV-assoziierten Demenz**
von J. Mötter (2010), VI, 172 Seiten
ISBN: 978-3-89336-604-0
20. **Biotransformationen mit Cytochrom P450 Monooxygenasen**
von D. Zehentgruber (2010), XI, 147 Seiten
ISBN: 978-3-89336-605-7
21. **Studies on central carbon metabolism and respiration of *Gluconobacter oxydans* 621H**
by T. Hanke (2010), 120 pages
ISBN: 978-3-89336-607-1
22. **Prozessentwicklung zur Produktion von 2-Keto-L-Gulonsäure, einer Vitamin C- Vorstufe**
von B. Osterath (2010), XXI, 213 Seiten
ISBN: 978-3-89336-612-5
23. **Visuell evozierte Antworten der corticalen Areale V1/V2 und V5/MT nach Schachbrettmusterumkehrreizung – Magnetenzecephalographische Untersuchungen in Kombination mit cytoarchitektonischen Wahrscheinlichkeitskarten**
von B. U. Barnikol (2010), III, 138 Seiten
ISBN: 978-3-89336-615-6
24. **Biochemische und regulatorische Analyse des TCA-Zyklus und Glyoxylat-Shunts in *Escherichia coli***
von M. Kunze (2010), 191 Seiten
ISBN: 978-3-89336-620-0
25. **Metabolomanalyse als Grundlage für ¹³C-Stoffflussanalyse und dynamischer Modellierung am Beispiel der Lysinbiosynthese**
von M. G. Wellerdiek (2010), xvi, 182 Seiten
ISBN: 978-3-89336-621-7
26. **Neue Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme für die Synthese enantiokomplementärer 2-Hydroxyketone**
von G. Kolter (2010), IX, 168 Seiten
ISBN: 978-3-89336-626-2
27. **Genetische Analyse von Substrat-Translokase-Wechselwirkungen bei der Tat-abhängigen Proteintranslokation in *Escherichia coli***
von F. Lausberg (2010), 174 Seiten
ISBN: 978-3-89336-628-6
28. **Silicium Nanodrähte für die extrazelluläre Ableitung elektrischer Aktivität**
von J. F. Eschermann (2010), xii, 191 Seiten
ISBN: 978-3-89336-639-2

29. **Causality measures between neural signals from invasively and non-invasively obtained local field potentials in humans**
by E. Florin (2010), xxix, 220 pages
ISBN: 978-3-89336-646-0
30. **Regulatory and metabolic aspects of the phosphate starvation response of *Corynebacterium glutamicum***
by H. M. Woo (2010), III, 111 pages
ISBN: 978-3-89336-664-4
31. **Ligand interaction analysis of membrane-anchored proteins**
by J. Glück (2010) VIII, 87 pages (getr. pag.)
ISBN: 978-3-89336-683-5
32. **Novel insights into characteristics, relevance, and regulation of corynebacterial aconitase**
by M. Baumgart (2010), V, 147 pages
ISBN: 978-3-89336-682-8
33. **Investigation of GABARAP complexes with apoptosis-related proteins and structural characterization of GABARAP lipidation**
by P. Ma (2011), VI, 139 pages (getr. pag.)
ISBN: 978-3-89336-699-6
34. **GABARAP-artige Proteine, Nix und Bcl-2: Strukturelle Basis molekularer Interaktionen an der Schnittstelle zwischen Autophagie und Apoptose**
von M. Schwarten (2011), VIII, 164 Seiten (getr. pag.)
ISBN: 978-3-89336-700-9
35. **Einflussfaktoren auf die Stabilität und Aktivität der Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* in Carboligasereaktionen mit aromatischen Aldehyden**
von M. Schwarz (2011), XI, 176 Seiten
ISBN: 978-3-89336-701-6



Gesundheit / Health
Band / Volume 35
ISBN 978-3-89336-701-6

